SYNTHESE EINES DEN ANTHRACYCLINEN STRUKTURELL VERWANDTEN ANTHRACHINONDERIVATES UND DESSEN BINDUNG MIT DESOXYRIBONUCLEINSÄURE

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

ROLF FLÜGEL
aus Jöllenbeck/Bielefeld

Göttingen 1967

Synthese eines den Anthracyclinen strukturell verwandten Anthrachinonderivates und dessen Bindung mit Desoxyribonucleinsäure

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Rolf Flügel
aus Jöllenbeck/Bielefeld

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Privatdozent Dr. W. Müller
Korreferent: Professor Dr. H. Brockmann

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 1967

Die vorliegende Arbeit wurde im Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr. W. Müller in der Zeit von Februar 1965 bis September 1967 durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,
Herrn Privatdozent Dr. W. Müller,
möchte ich für seine vielen Anregungen
und Hinweise herzlich danken.

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung und Aufgabenstellung 1

B. Synthese von 1.-(trans-3.-Dimethylamino-cyclohexyl)-2.-(ß-1.4.5.-trihydroxy-anthrachinon-[9.10.] -yl)-äthan (3a) 4

I. Allgemeiner Syntheseplan 4

1) Untersuchungen zur Alkylierung nach Marshalk 7

2) Synthese des trans-3-Dimethylamino-cyclohexylacetaldehyds 12

a) Darstellung der cis,trans-3-Dimethylamino-cyclohexylcarbonsäuren und deren Methylester 12

b) Darstellung und Eigenschaften von cis- und trans-3-Dimethylamino-cyclohexylcarbinol 16

α) Spektroskopische Konfigurationszuordnung 18

ß) Chemische Konfigurationszuordnung (Isolierung von 6.6.-Dimethyl-6.-azonia-bicyclo-[3.2.1.] -octan) 23

c) Darstellung des p-Toluolsulfonsäureesters von trans-3-Dimethylamino-cyclohexyl-carbinol 28

d) Darstellung des trans-3-Dimethylamino-cyclohexylacetonitrils 30

e) Darstellung des trans-3-Dimethylamino-cyclohexylacetaldehyds 31

Seite

3) Kondensation des trans-3-Dimethylamino-cyclohexylacetaldehyds mit 1.4.5.-Trihydroxy-anthrachinon-(9.10.) zum "Rhodomin" (3a) 34

4) Darstellung von Rhodomin-methojodid (38) 42

C. Zur Wechselwirkung von Rhodomin und verschiedener Anthracycline mit Desoxyribonucleinsäure 44

I. Spektraleffekte und Absorptionsisothermen der Farbstoff/DNS-Komplexe 44

II. Auswertung der Meßergebnisse 48

III. Diskussion 54

D. Zusammenfassung der Ergebnisse 56

Beschreibung der Versuche 58

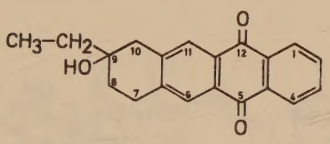
Anhang 1. Versuch zur Racematspaltung von d,l-Rhodomin-methojodid 75

2. Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Rhodomin-methojodid 76

Literaturverzeichnis 79

A. Einleitung und Aufgabenstellung

Die aus Kulturfiltraten verschiedener Streptomyces-Arten isolierten Anthracycline sind rote, wasserlösliche und basische Glykoside. Sie enthalten stets mindestens einen Aminozucker, der Rhodosamin genannt wird, und teilweise noch weitere neutrale Zuckerreste[1], die hydrolytisch leicht abgespalten werden. Dem farbigen Aglykon nach, das als Anthracyclinon[1] bezeichnet wird, sind die Anthracycline optisch aktive Derivate des 9.-Hydroxy-9.-äthyl-7.8.9.1o.-tetrahydrotetracenchinon-(5.12.) (1):



1

Sie sind von H.Brockmann und Mitarb. eingehend untersucht und in ihrer Struktur aufgeklärt worden[2].

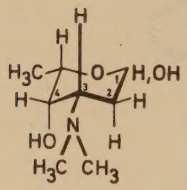
Unter den natürlichen Anthracyclinen haben einige Vertreter wegen ihrer hohen antibiotischen und cytostatischen Wirksamkeit großes Interesse gefunden (Cinerubin A und B[3] und Daunomycin[4]).

Über den biologischen Wirkungsmechanismus der Anthracycline ist bisher nicht viel bekannt. Eine italienische Arbeitsgruppe[5] berichtet, von der Fähigkeit dieser Stoffe, mit Desoxyribonucleinsäure Komplexe zu bilden, was im Göttinger Institut schon 1961 beobachtet wurde. Nach G.Hartmann et al.[6] hemmen diese Antibiotika sowohl die DNS-abhängige RNS-Synthese wie auch die DNS-Synthese selbst.

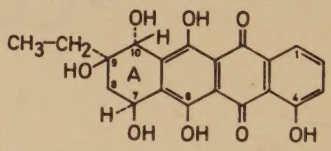
Demnach ist die Wechselwirkung der Anthracycline mit der DNS sehr wahrscheinlich verantwortlich für die gefundenen Effekte und somit wird die Untersuchung dieser Wechselwirkung zur Aufklärung der Wirkungsweise notwendig.

Erschwert wird eine solche Untersuchung jedoch dadurch, daß die nativen Anthracycline schlecht zugänglich sind, und eine Totalsynthese wegen des komplizierten stereochemischen Aufbaus nicht möglich ist. Deshalb erschien es wünschenswert, ein Strukturanalogon zum einfachsten Anthracyclin, dem ß-Rhodomycin B, zu synthetisieren.

ß-Rhodomycin B (2) besteht aus dem Aglykon ß-Rhodomycinon (2b) und einer Tridesoxy-dimethylamino-hexose, dem Rhodosamin (2a).



2a

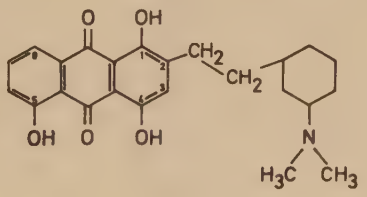


2b

Die UV-Spektren dieser Verbindung zeigen, daß 2a mit 2b nicht über die Hydroxygruppen des aromatischen Systems glykosidisch verbunden sein kann, sondern daß als Verknüpfungsstelle nur die Hydroxygruppen in 7-,9- oder 1o-Stellung in Betracht kommen, welche quasi-axial mit einer cis-Stellung zwischen den Gruppen an C-7 und C-9 angeordnet sind[7]. Einige Hinweise[8] deuten auf eine α-glykosidische Bindung zwischen 2a und der Hydroxygruppe in 7-Stellung.

Das zu synthetisierende ß-Rhodomycin-Analogon soll die für die Komplexbildung mit der DNS notwendigen funktionellen Gruppen im gleichen Abstand zueinander wie 2 enthalten. Zu diesen Gruppen muß man die drei phenolischen Hydroxyle und die für die Basizität verantwortliche 3 - Dimethylaminogruppe von 2a zählen. Auf den alicyclischen Ring A in 2 kann man zunächst verzichten, da seine Funktion bei der Bindung an die DNS nicht entscheidend sein kann. Das gleiche gilt für die Sauerstoffatome in der Glykosidbindung sowie im Pyranosering; einfachheitshalber sollen sie in der Modellverbindung durch Methylengruppen ersetzt werden.

Aus diesen Vereinfachungen ergibt sich als Rhodomycin-Analogon eine Verbindung der Struktur 3, die im ersten Teil dieser Arbeit hergestellt werden sollte.



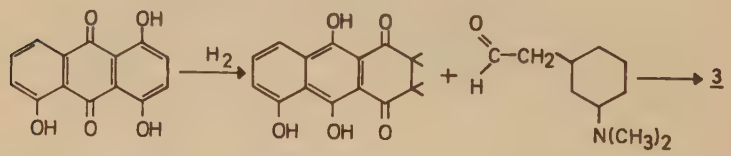
3

Als weitere Aufgabe war die Isotherme für die Bindung von 3 an DNS zu messen und mit den entsprechenden Isothermen einiger Anthracycline zu vergleichen.

B. Synthese von 1.-(trans-3.-Dimethylamino-cyclohexyl)-2.-(ß-1.4.5.-trihydroxy-anthrachinon-[9.1o.]-yl)-äthan, "Rhodomin" (3a)

I. Allgemeiner Syntheseplan

Das zu synthetisierende Anthracyclin-Analogon 3 besitzt die Struktur eines 2-alkylsubstituierten Hydroxyanthrachinons. Derartige Verbindungen sind nach der Marshalkschen Alkylierungsmethode zugänglich[10]. Bei dieser Reaktion lagert man einen Aldehyd an die Leukoform eines Hydroxyanthrachinons an. Da im Falle des 1.4.5.-Trihydroxy-anthrachinons (4) hauptsächlich in der 2-Stellung alkylierte Produkte entstehen[11], sollte 3-Dimethylamino-cyclohexyl-acetaldehyd (19) mit 4a die gewünschte Verbindung 3 ergeben.



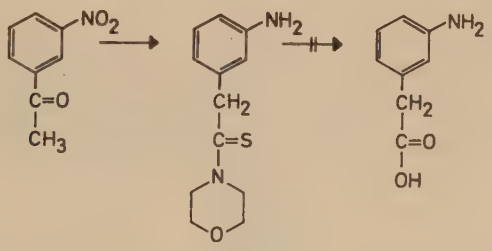
4 4a 19

Die Alkylierungsreaktion nach Marshalk ist bisher nicht in dem Maße untersucht worden, daß man zuverlässig voraussagen kann, ob sich basische Aldehyde der Formel 19 für eine Kernalkylierung eignen. Ferner zeichnet sich eine Abnahme der Reaktionsfähigkeit aliphatischer Aldehyde ab[11]; cycloaliphatische Aldehyde sind bislang noch gar nicht in die Marshalk-Reaktion eingesetzt worden. Es erschien deshalb ratsam, zunächst zu klären, ob diese Kondensations-Reaktion für die geplante Synthese überhaupt in Betracht kommt. Die Ergeb-

nisse dieser Voruntersuchungen werden in dem folgenden Kapitel dargelegt.

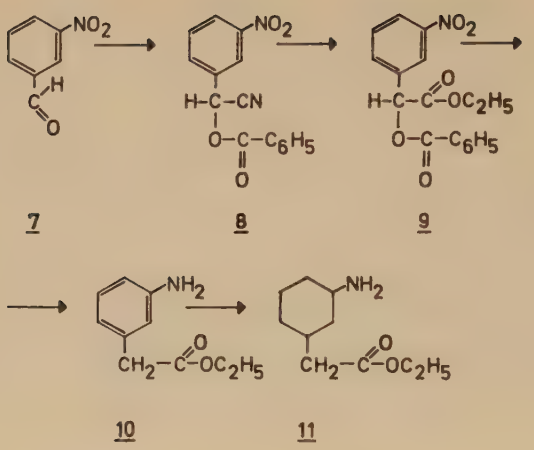
Zur Herstellung des als Reaktionspartner bisher unbekannten Aldehyds 19 gibt es mehrere Möglichkeiten, von denen sich jedoch die meisten als ungeeignet erwiesen. Im folgenden sind einige der möglichen Synthesewege, die ich eingehender untersucht habe, aufgeführt.

Geht man von m-Nitroacetophenon (5) aus und setzt mit Schwefel in Morpholin nach Willgerodt-Kindler um, bildet sich das kristalline Thiomorpholid 6 unter gleichzeitiger Reduktion der Nitrogruppe. Bei der anschließenden Verseifung mit Natronlauge erhält man jedoch nur harzige Produkte.



5 6

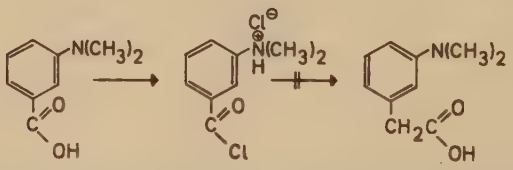
Wählt man m-Nitrobenzaldehyd (7) als Ausgangsprodukt und behandelt es mit Natriumcyanid und Benzoylchlorid, erhält man in einer Art Cyanhydrinsynthese das substituierte Derivat 8 des m-Nitromandelsäurenitrils, das sich mit Äthanol und Chlorwasserstoff in den Ester 9 überführen läßt. Da man zur Hydrogenolyse und Hydrierung des Äthylesters 9 rauhe Bedingungen anwenden muß[12], läßt sich 10 nur in sehr geringer Ausbeute isolieren. Auch die Reduktion von 10 zum Cyclohexanderivat 11 verläuft nicht glatt und liefert 11 nur in



7 8 9 10 11

mäßiger Ausbeute. Unterwirft man nun 11 der Leuckart-Wallach-Reaktion, um das entsprechende Dimethylamino-derivat von 11 zu erhalten, entstehen fast nur polymere Produkte.

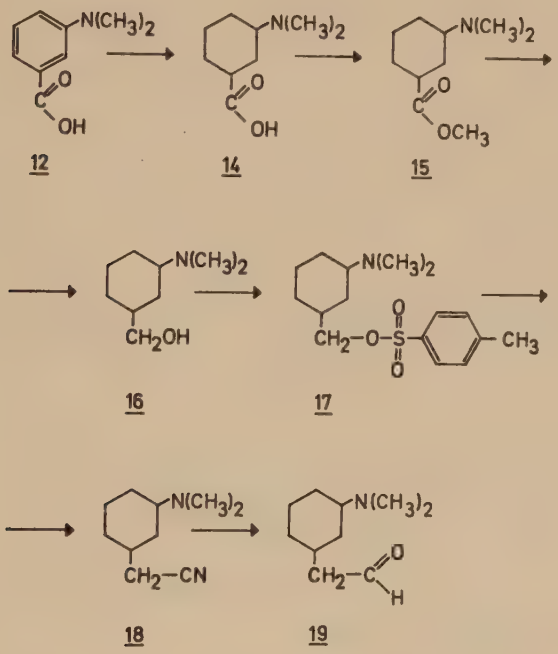
Schließlich wurde versucht, den gewünschten Aldehyd 19 mit



12 13

Hilfe der Arndt-Eistert-Reaktion aus m-Dimethylaminobenzoesäure herzustellen. Die Umsetzung des Säurechlorids 13 mit Diazomethan scheiterte jedoch an der Unlöslichkeit von 13 in Äther, da es nur als Amin-hydrochlorid zu erhalten war.

Folgender Syntheseweg führte schließlich zum Ziel:



Die einzelnen Reaktionsschritte werden später genauer beschrieben (s. Seite 12).

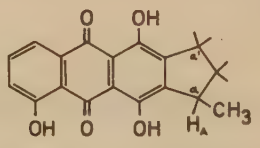
1. Untersuchungen zur Alkylierung nach Marshalk et al.

In der von Marshalk und Mitarb. angegebenen Arbeitsweise wird die mit alkalischer Natriumdithionit-lösung hergestellte Küpe des Hydroxyanthrachinons mit überschüssigem Aldehyd unter Stickstoff umgesetzt und anschließend zum alkylierten Anthrachinonderivat reoxydiert.

Da unter diesen Bedingungen stets größere Mengen Nebenprodukte (teils S-haltig) entstehen und die Reproduzierbarkeit schlecht ist, habe ich dieses Verfahren modifiziert, indem katalytisch erregter Wasserstoff als Reduktions- und Morpholin oder Triäthanolamin als Lösungsmittel verwandt wurde.

In weiteren Vorversuchen wurde der Anwendungsbereich der Marshalk-Reaktion untersucht. Dabei zeigte sich, daß Cyclohexylacetaldehyd, der zur Selbstkondensation neigt[13], höchstens in Spuren alkyliert. Andererseits kondensiert der zu Struktur 19 homologe 3-Dimethylamino-cyclohexylformaldehyd glatt und in guter Ausbeute nach Marshalk zum entsprechend substituierten Anthrachinonderivat. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß auch der Aldehyd 19 zur Kernalkylierung befähigt sein sollte und somit die Synthese des gewünschten Analogons 3 auf diesem Wege erfolgversprechend schien.

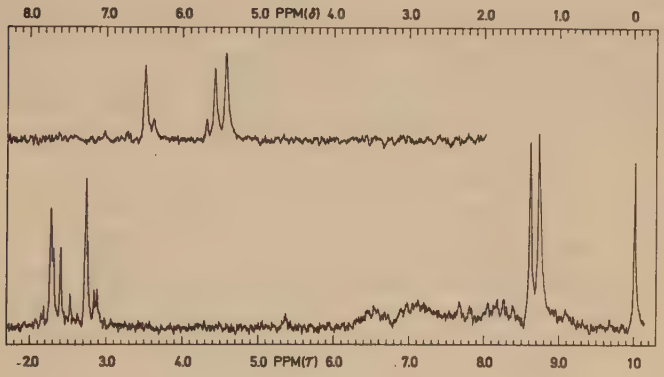
Im Rahmen dieser Vorversuche wurde auch Crotonaldehyd als Reaktionspartner für 1.4.5.-Trihydroxyanthrachinon (4) eingesetzt. Dabei bildete sich interessanterweise ein Produkt, dem man die mit Formel 20 wiedergegebene Struktur zuerteilen muß. Diese Formel, in der lediglich die Stellung der Mathylgruppe nicht eindeutig festgestellt werden kann (α oder α'), ergibt sich aus den folgenden Befunden:



20

Dem NMR-Spektrum (Abb. 1) ist zu entnehmen, daß nicht vier, sondern nur drei aromatische Protonen in 20 vorliegen. Da diese drei aromatischen Wasserstoffatome miteinander koppeln,

müssen sie einander benachbart sein. Das ist zugleich ein Beweis, daß der Cyclopentanring in 2.3.-Stellung mit dem



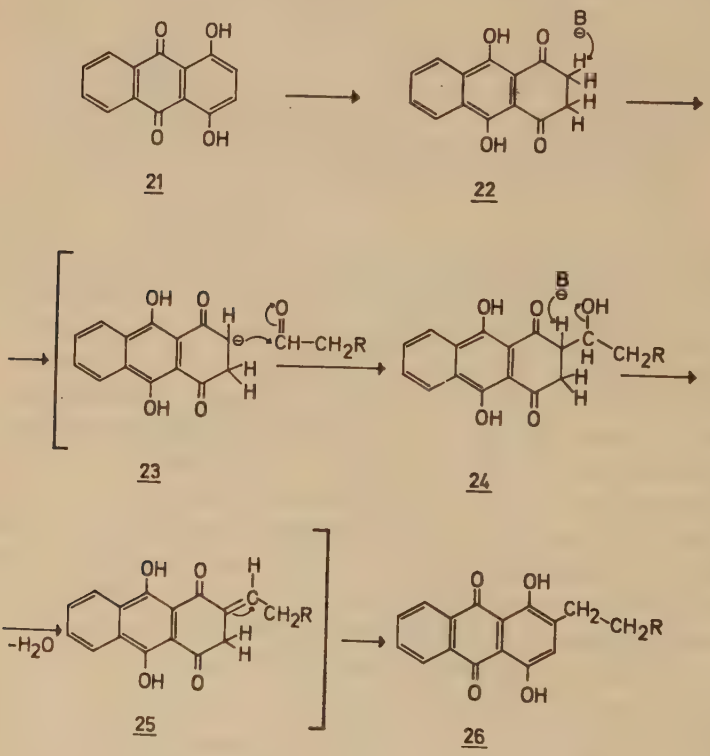
Abbild. 1 NMR-Spektrum von 1.4.5.-Trihydroxy-2.3.-(methylcyclopentano)-anthrachinon-(9.1o.) (2o) in Deuterochloroform

Anthrachinonrest verknüpft ist.

Erwartungsgemäß spaltet das H_A-Proton die Wasserstoffatome der Methylgruppe in ein Dublett bei τ = 8.67 ppm auf (J = 7.o Hz, rel. Intensität 3). Die restlichen Protonen des Fünfringes erscheinen als kompliziertes Multiplett, diejenigen der benzylständigen Methylengruppe bei τ = 7.1 (rel. Int. 2) und das Proton H_A bei τ = 6.6 ppm (rel. Int. 1). Die Signale der phenolischen Protonen erscheinen bei τ = -3.2o (1), -2.55 (1) und -2.32 ppm (1) in guter Übereinstimmung mit anderen 1.4.5.-Trihydroxyanthrachinon-derivaten[2].

Das Massenspektrum zeigt eine Molekülionspitze bei 31o, was sowohl mit der Fünfringstruktur der Seitenkette, wie mit einer ungesättigten Seitenkette zu vereinbaren wäre. Da letztere jedoch laut NMR-Spektrum auszuschließen ist und das vierte aromatische Proton fehlt, ist an der ringförmigen Anordnung

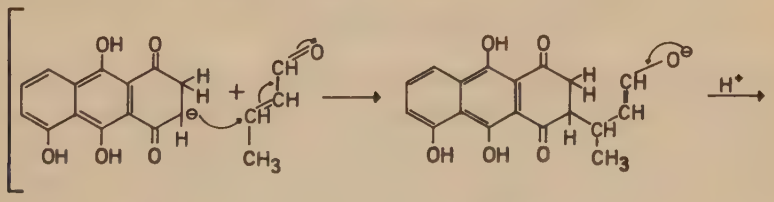
gemäß Struktur 20 nicht zu zweifeln.
Die gewonnenen Ergebnisse rechtfertigen einige Überlegungen zum Mechanismus der Marshalk-Reaktion. Berücksichtigt man, daß laut NMR-Messungen das 1.4.5.-Trihydroxyanthrachinon (4) analog zum 1.4.-Dihydroxyanthrachinon (21) bei der Reduktion im verwendeten Reaktionsmedium in die Dihydroform 22 übergeht[14], so läßt sich der Reaktionsablauf am besten im Sinne einer basisch katalysierten Aldolkondensation deuten :



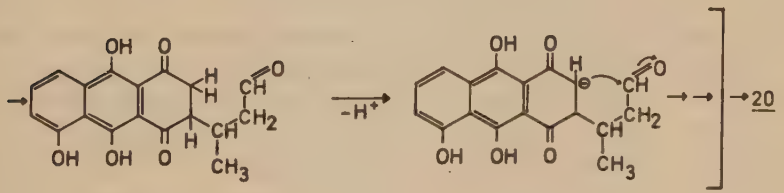
Dieses Schema erklärt zwanglos, warum eine bestimmte Basizität des Mediums für die Reaktion notwendig ist - in Pyridin bleibt die Alkylierung aus - zum andern, warum das Reaktionsprodukt

ohne Zusatz von Oxydationsmittel schon in reoxydierter, chinoider Form anfällt.

Im ersten Schritt müßte nach diesem Schema die Ablösung eines Protons aus der CH-aciden Verbindung 22 durch die Base B^- erfolgen, wobei das Anion 23 entsteht. An 23 addiert sich nun unter Knüpfung einer C-C-Bindung der Aldehyd (R = Alkyl). Aus der dabei hervorgehenden aldolartigen Zwischenstufe 24 wird erneut ein Proton abgelöst und die benachbarte Hydroxygruppe eliminiert. Dieser Dehydratisierungsschritt ist offensichtlich stark begünstigt, weil sich ein System konjugierter Doppelbindungen ausbilden kann. Eine anschließende Protonenverschiebung und Tautomerisierung in 25 könnte zum Endprodukt 26 führen. Die Reaktion, die zur Entstehung von 2o führt, dürfte ein Spezialfall der Marshalk-Kondensation sein. Vermutlich wird die Umsetzung durch eine Michael-Addition eingeleitet.



23a 23b



23c 23d

An das 23 analoge Reaktionsprodukt 23a lagert sich Crotonaldehyd mit dem positivierten ß-Kohlenstoffatom an. Es entsteht dabei ein Enolat-Anion 23b, das ein Proton des Lösungsmittels

bindet unter Bildung von 23c. Dieses reagiert dann über das Anion 23d im Zuge der normalen Marshalk-Reaktion (vergl. Formelschema Seite 10) zum cyclisierten Endprodukt 2o.

Würde dagegen die Reaktion mit einer Aldolkondensation beginnen, müßte die dabei entstehende, zu 25 analoge Zwischenstufe mit zwei konjugierten Doppelbindungen in der Seitenkette eine Michael-Addition eingehen. Da aber Diene normalerweise nicht die Reaktionsfähigkeit vinyloger Carbonylverbindungen erreichen, können sie auch nicht als Reaktionspartner in einer Michael-Addition fungieren[9]. Daher ist dieser Reaktionsablauf weniger wahrscheinlich als der zuerst diskutierte.

2. Synthese des trans-3-Dimethylamino-cyclohexylacetaldehyds (19)

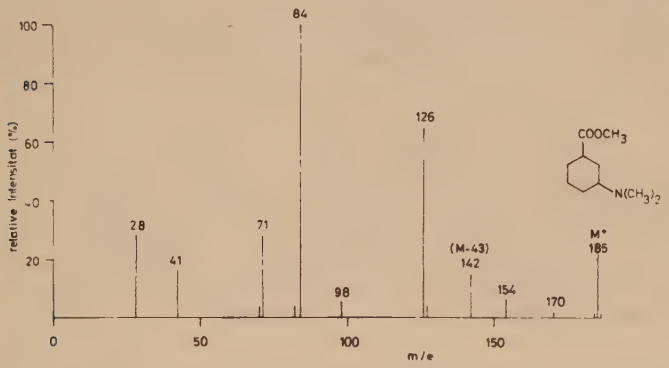
a) Darstellung der cis, trans-3-Dimethylamino-cyclohexylcarbonsäuren (14) und deren Methylester (15)

Ausgangssubstanz war m-Dimethylamino-benzoesäure (12), die in salzsaurer Lösung mit katalytisch erregtem Wasserstoff zum cis, trans-Gemisch der 3-Dimethylamino-cyclohexancarbonsäuren (14) hydriert wurde. Die dabei anfallenden kristallinen Hydrochloride wurden an einer Anionenaustauschersäule in die Verbindungen mit freier Dimethylaminogruppe überführt.

Diese farblosen Dimethylaminosäuren und alle anderen im Verlauf der Synthese dargestellten Verbindungen mit einem Dimethylaminorest sind auf Dünnschicht- und Papierchromatogrammen als orangerote Flecken sichtbar, wenn diese mit Dragendorff-Reagens[15] besprüht werden. Dieses Reagens zeigt das Vorliegen von tertiären Aminogruppen im Molekül an und erwies sich deshalb als gutes Hilfsmittel bei der chromatographischen Prüfung der jeweils anfallenden Reaktionsprodukte.

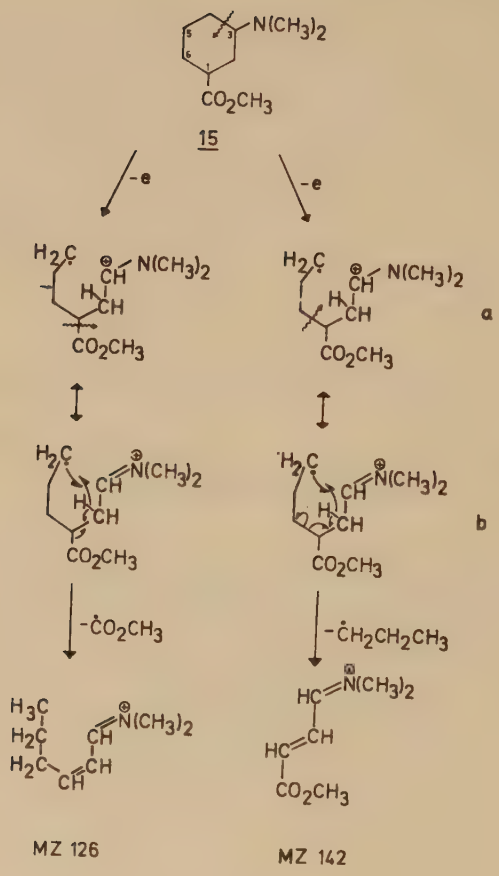
Die Säuren 14 wurden mit Diazomethan verestert. Die dabei entstehenden flüssigen Methylester 15 wandern im Dünnschichtchromatogramm (Methanol/Chloroform 1 : 1) als einheitliche Zone,

d.h. ohne Trennung der cis-trans-Isomere. Ihre Konstitution wurde auf folgende Weise gesichert:



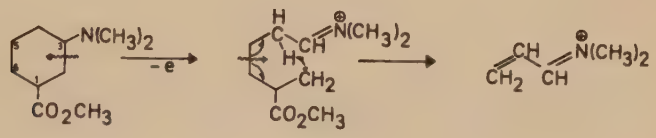
Abbild. 2 Massenspektrum von cis,trans-3-Dimethylamino-cyclohexancarbonsäuremethylester (15)

Im Massenspektrum der Methylester (15) (Abb. 2) sind neben der Spitze des Molekülions bei 185, charakteristische Bruchstücke mit den Massenzahlen 142, 126 und 84 zu beachten. Das erste Bruchstück ergibt sich daraus, daß bei Cyclohexylaminen eine primäre Spaltung bevorzugt an einer zur funktionellen Gruppe benachbarten C-C-Bindung erfolgt, wobei sich ein Resonanz-stabilisiertes Radikalkation bildet[16a)], im vorliegenden Fall a ↔ b.



Nach Wasserstoffverschiebung und Öffnung der Bindung zwischen C-1 und C-6 wird ein Propylradikal eliminiert und das stabile Fragment der Massenzahl 142 gebildet. Das Bruchstück der

Massenzahl 126 entsteht auf analoge Weise, wobei der $-CO_2CH_3$-Rest abgespalten wird. 15 kann schließlich noch auf andere Art im Massenspektrometer zerfallen, und zwar durch Spaltung der Bindung zwischen C-2 und C-3. Dabei entsteht ein Radikalkation (c), aus dem durch Wasserstoffverschiebung und Bruch der Bindung zwischen C-5 und C-6 ein doppelt konjugiertes Fragment

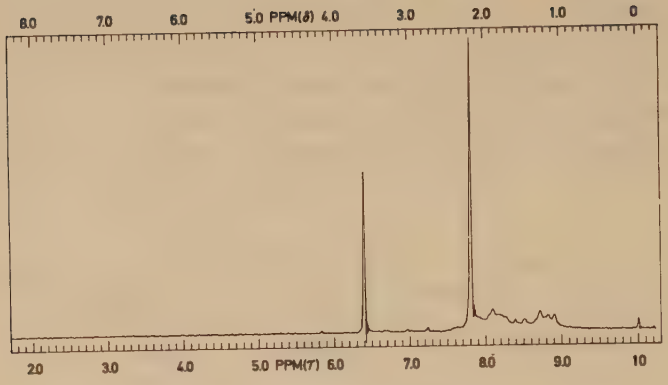


15 c MZ 84

der Massenzahl 84 hervorgeht, dessen Spitze im Spektrum die höchste Intensität erreicht.

Damit sind alle wesentlichen Strukturelemente des Methylesters 15 als Schlüsselbruchstücke im Massenspektrum aufgefunden.

Auch das NMR-Spektrum (Abb. 3) der Ester läßt sich zwanglos durch die Struktur 15 erklären. Die drei Protonen der Methylestergruppe absorbieren bei τ = 6.4o ppm als Singulett (rel. Int. 3). Das Singulett bei τ = 7.81 ppm (Int. 7) der sechs Dimethylaminoprotonen verdeckt das Signal eines Ringprotons. Im aliphatischen Absorptionsbereich von τ = 7.9-9.o ppm (Int. 9) erscheinen die restlichen Cyclohexanprotonen als kompliziertes Multiplett.



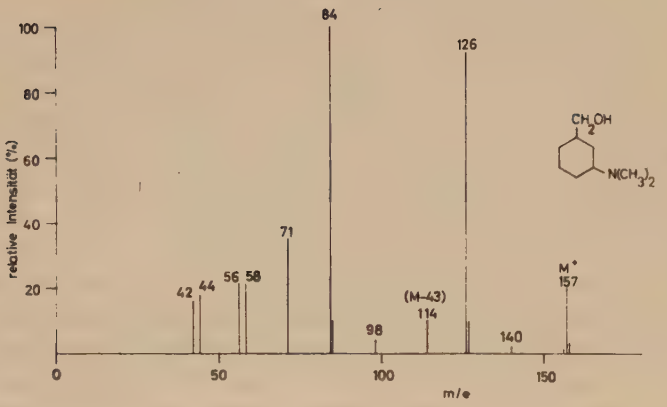
Abbild. 3 NMR-Spektrum von cis,trans-3-Dimethylamino-cyclohexancarbonsäuremethylester (15) in Deuterochloroform

b) Darstellung und Eigenschaften von cis- und trans-3-Dimethylamino-cyclohexylcarbinol (16a und 16b)

Die Reduktion der 3-Dimethylamino-cyclohexancarbonsäuremethylester (15) mit Lithiumaluminiumhydrid lieferte ohne Komplikationen das cis,trans-Gemisch der beiden 3-Dimethylamino-cyclohexylcarbinole (16).

Diese stellen viskose, hochsiedende Flüssigkeiten dar, die im Dünnschichtchromatogramm im System Aceton/konz. Ammoniak/Petroläther (Zusammensetzung s. Seite 58) unterschiedliche R_F-Werte zeigen. In ihren Siedepunkten unterscheiden sich die isomeren Alkohole um $10.5^{\circ}/2$ mm Hg, was ausreichte, um sie durch Destillation an einer Drehbandkolonne zu trennen.

Die beiden cis-,trans-isomeren Carbinole zerfallen unter Elektronenbeschuß im Massenspektrometer in Bruchstücke gleicher Massenzahl mit nahezu gleicher Intensität (s. Abb.4). Beide zeigen ein Molekülion der gleichen Massenzahl 157, was mit



Abbild. 4 Massenspektrum von cis,trans-3-Dimethylamino-cyclohexylcarbinol (16)

dem berechneten Molekulargewicht übereinstimmt. Der massenspektrometrische Abbau der Carbinole 16 verläuft völlig analog dem der Methylester 15 (s. Seite 15). So wird statt der Carbomethoxygruppe von 15 im Alkohol 16 der $-CH_2OH$-Rest eliminiert, was zu dem Fragment der Massenzahl 126 führt. Das Bruchstück der Massenzahl 114 in Abbild. 4 entspricht dem Spaltprodukt der Ester 15 mit der Massenzahl 142.

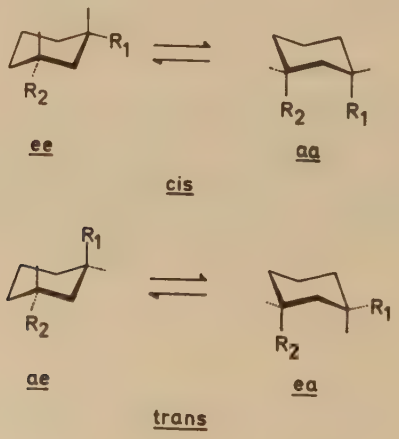
Die beiden isomeren Carbinole 16 lassen sich also nicht durch ihre Massenspektren voneinander unterscheiden, wohl aber zeigen sie in den Brechungsindices, Siedepunkten, R_F-Werten (im System Aceton/konz. Ammoniak/Petroläther) und in den NMR-Spektren Unterschiede, worauf im folgenden näher eingegangen wird.

α) Spektroskopische Konfigurationszuordnung

Der Cyclohexanring liegt aus energetischen Gründen in der Regel in der Sesselform vor. An diesem Sessel kann man zwei verschiedene Stellungen der Wasserstoffatome unterscheiden: 1. die Äquatorialstellung (e), in der die Bindungen, in der aus vier Ringatomen gebildeten Ebene liegen, und 2. die Axialstellung (a), bei der die Valenzen senkrecht zu dieser Ebene weisen. Das gleiche gilt für etwaige Substituenten.

Durch Umklappen kann eine Sesselform in eine zweite übergehen. Für den unsubstituierten Cyclohexanring sind beide Sesselformen gleich, während sich die Konstellationen des Moleküls bei substituierten Cyclohexanderivaten unterscheiden. Beim Umklappen gerät nämlich jeder Substituent, der sich zunächst in Äquatorialstellung befunden hatte, in Axialstellung und umgekehrt.

Speziell bei 1.3-disubstituierten Cyclohexanderivaten stehen die Substituenten im cis-Isomeren diäquatorial (ee) bzw. diaxial (aa) und in der trans-Verbindung axial-äquatorial (ae) bzw. äquatorial-axial (ea).

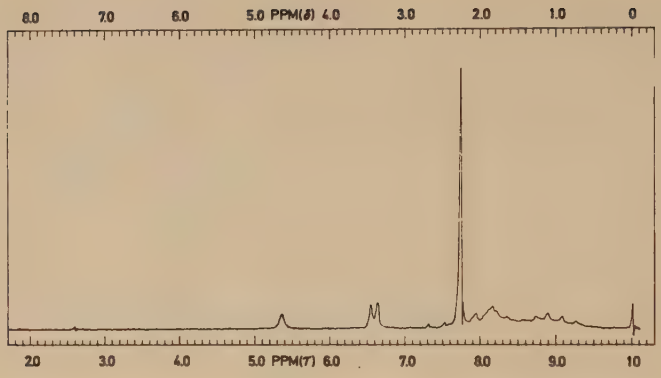


In den Protonenresonanz-Spektren substituierter Cyclohexane absorbieren die Protonen, die zusammen mit einem Substituenten, der kein Alkylrest ist, an einem gemeinsamen C-Atom stehen, normalerweise bei sehr viel tieferen Feldstärken als die Protonen der Methylengruppen des Ringes[17]. Deshalb werden hauptsächlich diese Wasserstoffatome - im folgenden als H_X-Protonen bezeichnet - zur Konfigurations- und Konformationsanalyse herangezogen. Außerdem absorbieren äquatoriale Protonen meist bei niedrigerem Feld als axialständige Protonen, die durch den Ring und benachbarte, ebenfalls axialständige Protonen stärker abgeschirmt sind[18a]. Diese allgemeinen Regeln sind auch bei der Interpretation der NMR-Spektren der isomeren Carbinole 16 von Bedeutung.

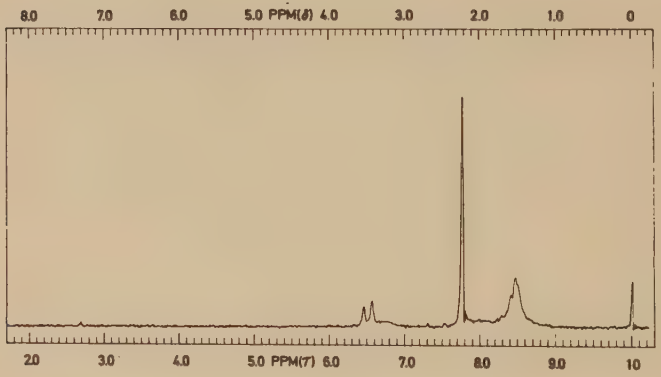
Die Abbildungen 5 und 6 zeigen die in Deuterochloroform gemessenen NMR-Spektren der beiden Alkohole 16.

Im Spektrum des höhersiedenden Isomeren (Abb. 5) muß das Singulett bei τ = 5.35 ppm (rel. Int. 1) dem Proton der Hydroxygruppe, das Dublett bei τ = 6.60 ppm (J = 5.5 Hz, Int. 2) den dieser Gruppe benachbarten Methylenprotonen zugeordnet werden. Das Singulett bei τ = 7.74 ppm der rel. Intensität 7, das von den sechs Protonen der Dimethylaminogruppe herrührt, verdeckt das Signal des am gleichen C-Atom stehenden H_X-Protons. Die restlichen Ringprotonen erscheinen als kompliziertes Multiplett bei τ = 7.9 bis 9.3 ppm (Int. 9).

Im NMR-Spektrum des isomeren Alkohols mit niedrigerem Siedepunkt (Abb. 6) absorbiert das Proton der Hydroxygruppe bei τ = 6.7 ppm. Dieses breite Singulett überlappt teilweise ein Dublett bei τ = 6.51 ppm (J = 6.5 Hz, Int. 2). Dieses Dublett muß den am gleichen C-Atom stehenden Protonen der Methylengruppe zugeschrieben werden. Die sechs Wasserstoffatome der Dimethylaminogruppe und das H_X-Proton geben sich als Singulett bei τ = 7.77 ppm (Int. 7) zu erkennen. Das charakteristische Multiplett bei τ = 8.47 ppm wird durch die übrigen neun Cyclohexanprotonen veranlaßt.



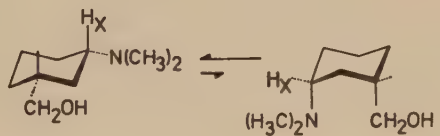
Abbild. 5 NMR-Spektrum von cis-3-Dimethylamino-cyclohexyl-carbinol (16a) in Deuterochloroform



Abbild. 6 NMR-Spektrum von trans-3-Dimethylamino-cyclohexyl-carbinol (16b) in Deuterochloroform

Vergleicht man nun die τ -Werte der Hydroxy-, Hydroxymethylen- und der Dimethylamino-protonen der beiden Isomeren miteinander, so zeigt sich, daß sämtliche Signale im höhersiedenden Alkohol bei niedrigeren Feldstärken liegen als die entsprechenden Signale in der isomeren Verbindung. Das ist nach dem Vorhergegangenen nur zu verstehen, wenn man für die $-CH_2OH$-, wie für die Dimethylaminogruppe, je eine bevorzugte äquatoriale Stellung annimmt. Diese diäquatoriale Konformation kann im Falle von 1.3-substituierten Cyclohexanen nur durch cis-ständige Reste ausgebildet werden. Daher muß dem höhersiedenden Alkohol die cis-Konfiguration zugeschrieben werden.

Dieses cis-Isomere dürfte aus energetischen Gründen bei Raumtemperatur überwiegend in der stabileren diäquatorialen Kon-



ee aa

16a

formation vorliegen[19]. Da für die Signale aller Ringprotonen an einem rasch umklappenden Sechsring nur der Mittelwert der Signale beider am Gleichgewicht beteiligter Konstellationen zu erwarten ist[17], wird verständlich, daß im trans-Alkohol eine relativ scharfe Bande der Cyclohexanprotonen zu beobachten ist. Denn in der trans-Verbindung beteiligten sich die ae- und die ea-Konformeren zu etwa gleichen Teilen am Konstellationsgleichgewicht. Demgegenüber weist die starke Verbreiterung und Aufspaltung der entsprechenden Bande im cis-Isomeren[16a] daraufhin, daß die diäquatoriale Konformation weitgehend bevorzugt wird.

Im vorliegenden Fall ist das von Feltkamp et al.[17] angegebene Verfahren, mit Hilfe der Bandenbreite des H_X-Protons die Konformation zuzuordnen, nicht anwendbar, da das Signal dieses Protons mit dem Singulett der Dimethylaminogruppe überlappt.

In ihren Brechungsindices unterscheiden sich die beiden cis, trans-Carbinole nur geringfügig; cis: n_D^{20} 1.4853, trans: n_D^{20} 1.4842. Relativ groß ist, wie schon erwähnt, die Differenz der Siedepunkte, nämlich 10.5°. Die modifizierte Auwers-Skita-Regel besagt, daß von einem Paar cyclischer cis-,trans-Isomeren, dasjenige mit dem kleineren Brechungsindex und oft auch dem niedrigeren Siedepunkt, die stabilere Konformation besitzt[20]. Danach müßten im vorliegenden Fall die Konstellationen und damit auch die Konfigurationen, den NMR-Daten widersprechend, umgekehrt zugeordnet werden. Da aber in der Literatur schon andere Ausnahmen von der Auwers-Skita-Regel beschrieben sind, und die unterschiedlichen Werte der Lichtbrechung für die beiden Isomeren fast innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmungsmethode liegen, erscheint es gerechtfertigt, die nach den zuverlässigeren NMR-Spektren getroffene Konfigurationszuordnung, beizubehalten.

Bevor auf den chemischen Konfigurationsbeweis eingegangen wird, sei das dünnschichtchromatographische Verhalten der cis- und trans-3-Dimethylamino-cyclohexylcarbinole diskutiert. Von H.Feltkamp u. W.Koch [21] ist an 3-alkylsubstituierten Cyclohexylaminen gezeigt worden, daß von zwei Isomeren, dasjenige mit der am stärksten abgeschirmten Aminogruppe den größeren R_F-Wert besitzt. Dieses Verhalten läßt sich dadurch erklären, daß man annimmt, daß die polare Aminogruppe mit dem einsamen Elektronenpaar bei den Adsorptionsvorgängen, die zur Trennung führen, eine ausschlaggebende Rolle spielen wird. Die starke Abschirmung der axialständigen Aminogruppe durch den Cyclohexanring führt zu einer verminderten Haftfestigkeit des Moleküls am Adsorbens und damit zu einer höheren Wanderungsgeschwindigkeit: der R_F-Wert wird also größer[21].

Tatsächlich wandert der trans-Alkohol 16b schneller als die cis-Verbindung 16a. Damit gilt auch für die 3-Dimethylaminocyclohexylcarbinole, daß das Isomere den höheren R_F-Wert hat, das den höheren Anteil an axialständiger Dimethylaminogruppe im Konstellationsgleichgewicht aufweist.

Somit kann man das dünnschichtchromatographische Verhalten von 16 als einfache Methode benutzen, um erste Anhaltspunkte für die zunächst unbekannte Konfiguration der Amine zu erhalten. Ein Beweis müßte in jedem Fall gesondert erbracht werden.

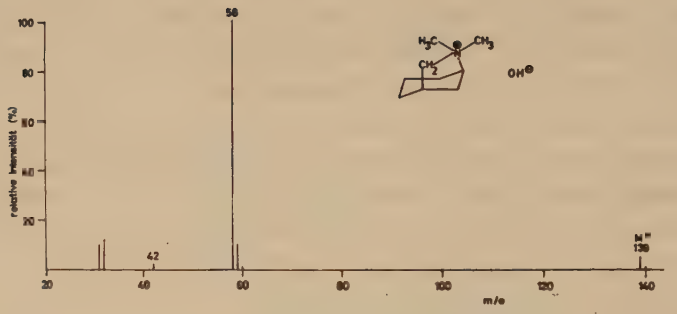
ß) Chemische Konfigurationszuordnung

Isolierung von 6.6.-Dimethyl-6.-azonia-bicyclo-[3.2.1.]-octan (27)

Bei der Umsetzung des cis-Alkohols 16a mit p-Toluolsulfonsäurechlorid in Pyridin bei 0° entsteht in fast quantitativer Ausbeute eine farblose, leicht wasserlösliche Substanz, die durch Dragendorff-Reagens im Unterschied zu allen anderen Verbindungen (14-19) intensiv dunkelrot angefärbt wird. Das Produkt läßt sich mit einem Anionenaustauscher in einen ätzenden, stark basisch reagierenden Stoff überführen. Es war zu vermuten, daß es sich bei dieser Substanz um ein quarternäres Ammoniumhydroxid handelte.

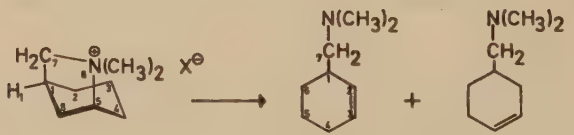
Im Massenspektrometer (Abb. 7) wird ein Molekülion der Massenzahl 139 gebildet. Außerdem tritt ein Bruchstück hoher relativer Intensität mit der Massenzahl 58 auf, dem als typischen Aminfragment die Struktur $CH_2=N(CH_3)_2$ zugeschrieben wird[16b].

Es ist bekannt, daß Quartärbasen beim Aufheizen im Massenspektrometer einen thermischen Hofmann-Abbau erleiden und tertiäre Amine bilden[35].



Abbild. 7 Massenspektrum von 6.6.-Dimethyl-6.-azonia-bicyclo-[3.2.1.]-octan (27)

In 27a kann das Anion OH^- an drei ß-ständigen Kohlenstoffatomen, nämlich am C-1, C-4 und am C-8 angreifen. Dabei entstehen die isomeren Amine 28a -c, die sich durch die Lage der Doppelbindung voneinander unterscheiden (28c = 1-Methyldimethylamino-cyclohexen-(1.).



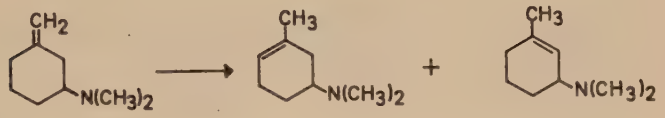
27 a: $X^{\ominus}$ = OH
b: $X^{\ominus}$ = Cl

28a 28b

Ihre Molekulargewichte stimmen mit dem im Spektrum (Abb. 7) gefundenem Molekülion der Massenzahl 139 überein.

Aus dem Angriff der Base auf C-8 in 27a können theoretisch auch noch das tertiäre Amin 29 mit exocyclischer Doppelbindung

und dessen Umlagerungsprodukte 30 und 31 hervorgehen, auf die ebenfalls die Massenzahl 139 paßt.



29 30 31

Diese Amine 29 - 31 vermögen jedoch nicht das Auftreten des sehr intensiven Ions der Massenzahl 58 zu erklären, dessen Entstehung aus 28 plausibel durch Bindungsspaltung zwischen C-1 und C-7 gedeutet werden kann.

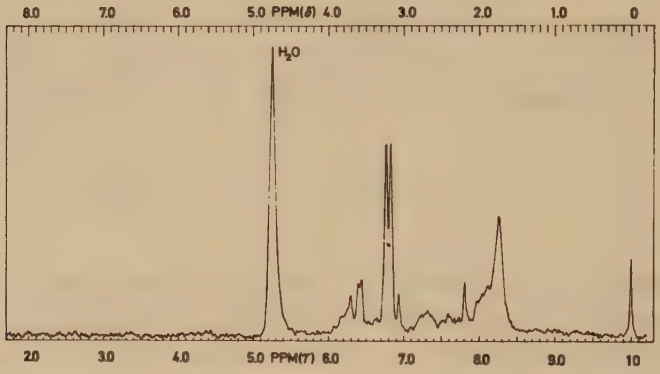
Daher darf man annehmen, daß 28 wahrscheinlich das Hauptprodukt des thermischen Hofmann-Abbaus ist und somit ursprünglich 27a vorgelegen hat.

Auch das in D_2O gemessene NMR-Spektrum (Abb. 8) läßt sich befriedigend mit der Struktur des 6.-Aza-bicyclo-octan-derivats 27a interpretieren.+)

Das Signal der beiden Methylgruppen in 27a erscheint im Unterschied zu allen anderen Verbindungen 14 - 19 als Dublett bei τ = 6.79 (J = 4 Hz, Int. 6). Diese Aufspaltung wird verursacht durch die verschiedene chemische Umgebung der beiden Methylgruppen in diesem asymmetrischen, bicyclischen Ringsystem. Die Protonen der C-7 Methylengruppe werden durch das H_1-Proton in ein Dublett (J = 2.5 Hz, Int. 2) bei τ = 6.42 aufgespalten.

+) kürzlich wurde ein Abbauprodukt des Antibiotikums Actinobolin beschrieben, dem das gleiche Azabicyclo-octansystem wie 27 zugrunde liegt[30].

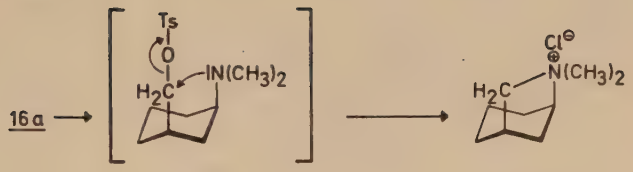
Das Multiplett bei τ = 6.25 (Int. 1) ist dem am Brückenkopfatom C-5 stehenden Proton zuzuordnen. Die übrigen Ringprotonen



Abbild. 8 NMR-Spektrum von 6.6.-Dimethyl-6.-azoniabicyclo-[3.2.1.]-octan (27a) in D_2O

absorbieren bei τ = 7.0 - 8.4 als Multiplett der Intensität 9. Es war also statt des gewünschten cis-Tosylesters von 16a, lediglich 27b entstanden.

Wahrscheinlich geht 27b aus dem intermediär gebildeten cis-Tosylat von 16a hervor. Dabei greift die Dimethylaminogruppe mit seinem freien Elektronenpaar am tosylresttragenden C-Atom intramolekular an (16c, Ts = Tosylatrest). Gleichzeitig mit der Knüpfung der neuen Bindung wird die Tosylgruppe eliminiert. Die Bildung von 27b läuft rasch und bevorzugt ab, weil die Eliminierung des Tosylatrestes sterisch beschleunigt wird.



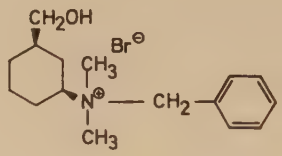
16c 27b

Stereochemisch ist die leichte Cyclisierbarkeit zum Bicyclo-octanderivat 27 nur dann möglich, wenn man annimmt, daß ursprünglich der cis-Alkohol 16a vorgelegen hat. Denn allein im cis-Isomeren sind die sterischen Verhältnisse zur Bildung einer einseitig überbrückten Bicycloverbindung der Struktur 27 vorgegeben. Erfüllt werden diese Voraussetzungen durch das Konformere des cis-Alkohols, in dem beide Substituenten die axiale Stellung einnehmen. Die ae- bzw. ea-Konstellationen des trans-Isomeren können nicht die unter milden Bedingungen verlaufende Entstehung von 27b verursachen. Denn im Gegensatz zum cis-Alkohol 16a liefert die isomere trans-Verbindung bei der Umsetzung mit Tosylchlorid in Pyridin das kristalline Hydrochlorid des trans-Tosylats 17 in hoher Ausbeute.

Damit ist ein weiterer und unabhängiger Konfigurationsbeweis für den cis-Alkohol 16 erbracht.

Versuche, die darauf abzielten, die Bildung des bicyclischen, quarternären Ammoniumchlorids 27b durch Erniedrigung der Temperatur zu unterdrücken, schlugen fehl. Verwendet man andererseits statt p-Toluolsulfonsäurechlorid, Thionyl- oder Methansulfonyl-chlorid erhält man in jedem Falle das gleiche Produkt 27b. Um die Entstehung von 27 zu verhindern, kann man die Dimethylaminogruppe vor der Tosylierung des alkoholischen Hydroxyls in 16a durch Quarternisieren mit Benzylbromid

schützen. Man erhält so das quarternäre Ammoniumbromid 32, dessen NMR-Spektrum mit der erwarteten Struktur in Übereinstimmung steht.

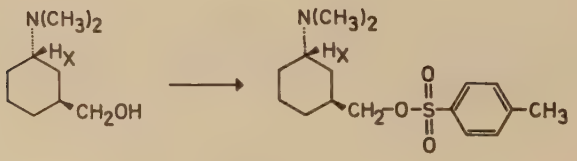


32

Setzt man 32 mit Tosylchlorid um, entstehen auch unter milden Bedingungen mindestens sieben verschiedene Produkte. Ich habe deshalb auf die Darstellung des cis-Tosylats verzichtet und nur das trans-Tosylat 17 weiterverarbeitet.

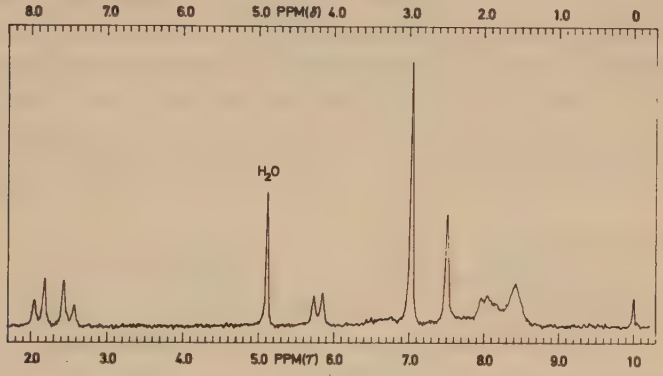
c) Darstellung des p-Toluosulfonsäureesters von trans-3-Dimethylamino-cyclohexylcarbinol (17)

Löst man den trans-Alkohol 16b in trockenem Pyridin und versetzt mit der äquimolekularen Menge an Tosylchlorid, so bildet sich trans-3-Dimethylamino-cyclohexylmethyl-tosylester (17) innerhalb von 36 Stunden in über 9o % Ausbeute.



16b 17

Die Struktur von 17 ergibt sich aus dem NMR-Spektrum (Abb.9), welches im aromatischen Absorptionsbereich ein typisches A_2B_2-System mit einer Kopplungskonstanten von J_{ortho} = 8 Hz bei τ = 2.5o und τ = 2.11 (rel. Int. 4) erkennen läßt. Diese



NMR-Spektrum des p-Toluosulfonsäureesters von trans-3-Dimethylamino-cyclohexylcarbinol (17) in D_2O

Signale sind den aromatischen Wasserstoffatomen zuzuordnen. Die aromatische Methylgruppe erscheint erwartungsgemäß als Singulett bei τ = 7.51 der Intensität 3. Die benzylständigen Protonen bilden ein Dublett bei τ = 5.80 (J = 7 Hz, Int. 2). Die sechs Protonen der Dimethylaminogruppe sind als Singulett bei τ = 7.04 (Int. 6) sichtbar. Das Multiplett des H_X-Protons liegt bei τ = 6.6 (Int. 1); die Ringprotonen absorbieren als Multiplett bei τ = 7.6 - 8.5 der Int. 9.

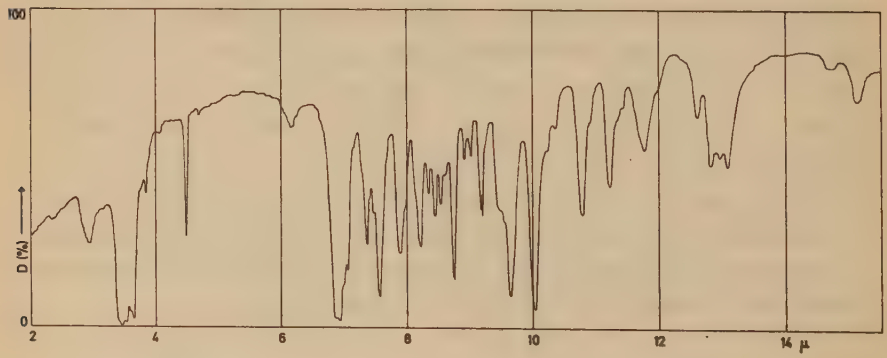
Behandelt man 17 mit Sodalösung, erhält man die freie Base des Tosylesters. Dieses trans-Tosylat ist eine stabile Substanz, im Gegensatz zu seinem cis-Isomeren, das wegen seiner großen Reaktionsfähigkeit nicht gefaßt werden konnte.

d) Darstellung des trans-3-Dimethylamino-cyclohexyl-acetonitrils (18)

Der Tosylester 17 reagiert mit Natriumcyanid bei Raumtemperatur innerhalb von 2-3 Tagen zum trans-3-Dimethylamino-cyclohexylacetoniltril 18. Die Umsetzung läuft bevorzugt im aprotischen Lösungsmittel Dimethylsulfoxid ab, das Nebenreaktionen nach dem S_N1-Typ verhindert. Der Tosylrest wird dabei nucleophil durch das Cyanidion substituiert in einer S_N2-Reaktion:

17 18

Die Struktur des Nitrils 18 wird durch das IR- und NMR-Spektrum bestätigt. Die scharfe Nitrilbande (Abb. 10) liegt bei 2225 cm^{-1}(4.49 µ).



Abbild.10 IR-Spektrum von trans-3-Dimethylamino-cyclohexyl-acetonitril (18) in KBr

Im Protonenresonanz-Spektrum überlagert das Singulett der beiden Methylgruppen bei τ = 7.77ppm das Signal des $-CH_2CN-$ Restes. Die restlichen Protonen des Cyclohexanringes erscheinen als Multiplett im aliphatischen Absorptionsbereich.

Das Nitril läßt sich im Vakuum destillieren; es besitzt einen süßlichen Geruch. Der R_F-Wert im Lösungsmittelsystem A liegt zwischen dem des trans-Alkohols 16b und dem des Tosylesters 17.

e) Darstellung des trans-3-Dimethylamino-cyclohexyl-acetaldehyds (19)

Um das Nitril 18 in den 3-Dimethylamino-cyclohexylacetaldehyd 19 zu überführen, mußte ein Verfahren gewählt werden, das erlaubt, unter milden Bedingungen den unbekannten, eventuell empfindlichen Aldehyd 19 herzustellen. Dazu eignet sich in hervorragender Weise eine kürzlich von H.C.Brown et al.[22] angegebene allgemeine Methode zur Synthese von Aldehyden aus Nitrilen.

Als Reduktionsmittel dient Lithiumaluminium-triäthoxy-hydrid, das man sich einfach aus 1.5 Mol Essigester und 1 Mol $LiAlH_4$ bereitet. In diesem Reagens ist im Gegensatz zum $LiAlH_4$ nur noch ein Hydridion zur Reaktion verfügbar. Dadurch wird die normalerweise stattfindende Reduktion eines Nitrils zum Amin bereits auf der Iminstufe 33 unterbrochen.

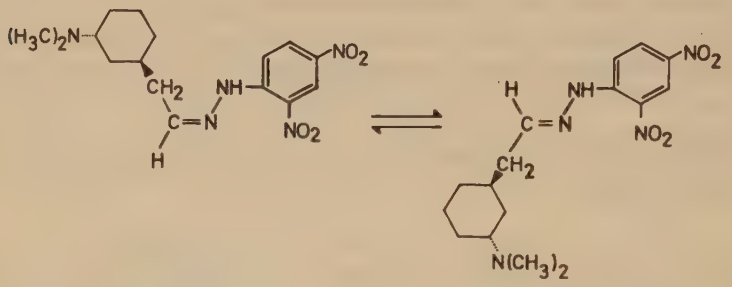
$$R-C\equiv N \;+\; H-Al(OC_2H_5)_3Li \longrightarrow R-\overset{H}{C}=N-Al(OC_2H_5)_3Li$$

33

Diese Additionsverbindung aus Aldimin und $LiAl(OC_2H_5)_3$ wird durch verdünnte Säuren glatt in Aldehyd und Aluminiumhydroxid zerlegt.

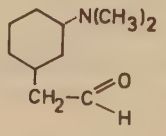
Der so gewonnene Aldehyd 19 ist eine farblose und angenehm riechende Flüssigkeit, die mit 2.4-Dinitrophenylhydrazin in

30 % Perchlorsäure momentan zu einem Gemisch der stereoisomeren 2.4.-Dinitrophenylhydrazon-hydroperchloraten 34a und 34b reagiert.



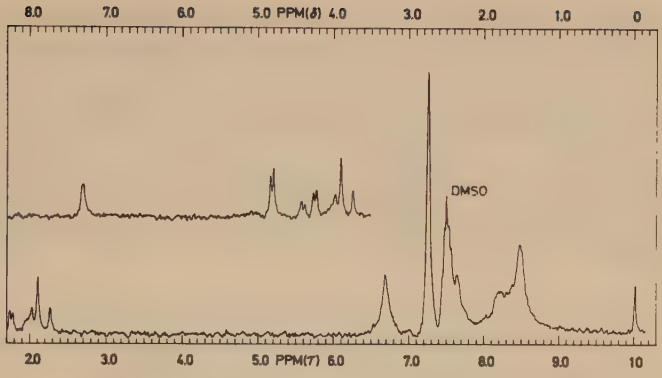
34a (syn) 34b (anti)

Nach dem in d-Dimethylsulfoxid gemessenen NMR-Spektrum von 34 (Abb. 11) muß dem ursprünglich vorgelegenem Aldehyd die Struktur 19 zugeschrieben werden:



19

Das bei relativ niedrigen Feldstärken absorbierende NH-Proton bei τ = -1.30 ppm (Singulett der Int. 1) ist seiner Lage nach typisch für 2.4.-Dinitrophenylhydrazone[18b]. Das gleiche gilt für die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten der drei aromatischen Wasserstoffatome.



Abbild. 11 NMR-Spektrum der 2.4.-Dinitrophenylhydrazone (34a u. b) in d-Dimethylsulfoxid

Das von zwei Nitrogruppen flankierte H_C-Proton (siehe Formelbild 34b) erscheint als Dublett der Intensität 1 bei 1.18 ppm (J_{BC}= 2.4 Hz). Das doppelte Dublett bei 1.58 ppm (Int. 1, J_{ortho}= 9.0 Hz, J_{meta}= 2.8 und 2.3 Hz) muß dem Proton H_B zugeordnet werden. Das Proton H_A bei 2.27 ppm (Dublett der Int. 1, J_{ortho}= 9.5 Hz) verdeckt das Signal, das dem Proton der CH=N-Gruppe bei 2.02 ppm zugehört. Die sechs Wasserstoffatome der Dimethylaminogruppe bilden ein Singulett bei τ = 7.26 ppm.

Die genaue Zuordnung der übrigen Banden wird schwierig, weil sich die zwei Signalpaare, die von der syn- un der anti-Form verursacht werden, gegenseitig überlagern. Das bei τ = 7.5 ppm liegende Multiplett, das größtenteils von nicht vollständig deuteriertem Dimethylsulfoxid verdeckt wird, ist in einem in Trifluoressigsäure aufgenommenen Spektrum deutlich erkennbar. Da bekannt ist, daß das Isomerenverhältnis von 34a und b lösungsmittelabhängig ist[18c], sind auch andere in einem in CF_3COOH gemessenen Spektrum gefundene Unterschiede verständlich.

Da manche Aminoaldehyde zu Selbstkondensationen neigen und in der Literatur als relativ instabil beschrieben sind, setzte ich den gewonnenen Aldehyd 19 sofort in die Marshalk-Reaktion ein, um die erwünschte Modellverbindung 3 zu erhalten.

3) Darstellung von 1.-(trans-3.-Dimethylamino-cyclohexyl)-2.-(ß-1.4.5.-trihydroxy-anthrachinon- [9.10.] -yl)-äthan (3), "Rhodomin"

1.4.5.-Trihydroxy-anthrachinon-(9.10.) wurde in Morpholin/Wasser (3:2) gelöst und in Gegenwart von Raney-Nickel mit katalytisch erregtem Wasserstoff bis zur Aufnahme von 1 Mol H_2 hydriert. Dabei schlägt die anfangs rotviolett gefärbte Lösung nach braungelb um, da sich das Leukoanthrachinonderivat gebildet hat. Setzt man nun die vom Katalysator getrennte Lösung unter Luftausschluß mit dem trans-3-Dimethylamino-cyclohexyl-acetaldehyd 19 um, bildet sich nach kurzer Zeit die ursprüngliche Farbe der Reaktionsmischung zurück, was anzeigt, daß die entstandenen Hydroxyanthrachinon-derivate bereits reoxydiert vorliegen.

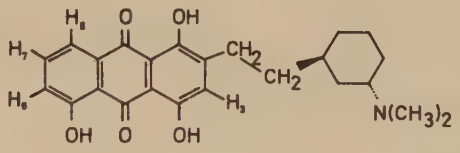
Man extrahiert aus sodaalkalischer Lösung und trennt die Reaktionsprodukte säulenchromatographisch. Diese Auftrennung erwies sich als außerordentlich schwierig, weil das 2- und das 3-substituierte Trihydroxyanthrachinon (3a bzw. 3b) nebeneinander entstanden waren und dies Substanzen mit extrem ähnlicher Struktur sind.

Nach vielen vergeblichen Versuchen gelang die chromatographische Trennung in einem Vierkomponentensystem an einer Calciumsulfat/Kieselgel-Säule.

Das schnelle laufende Hauptprodukt - die Ausbeute betrug 37 % - kristallisiert in roten, derben Nadeln aus Äthanol/Chloroform und ist in Chloroform und Kohlenstofftetrachlorid löslich, in Methanol und besonders in Wasser löst es sich nur schwer. Wenn man es in wenig heißem Pyridin anlöst und dann

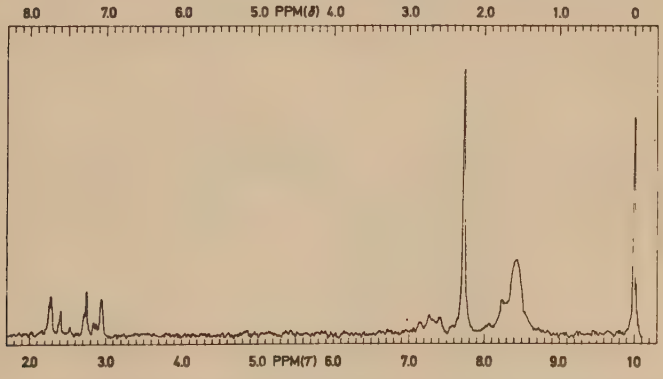
mit Wasser verdünnt, gelingt es, wässrige Lösungen nennenswerter Konzentrationen herzustellen.

Aus den im folgenden beschriebenen Untersuchungen geht hervor, daß es sich bei dieser Substanz um Verbindung 3a handeln muß und damit das Ziel der Synthese erreicht war. Der Einfachheit halber soll diese Verbindung im folgenden als "Rhodomin" bezeichnet werden.



3a

Das in Deuterochloroform gemessene NMR-Spektrum von 3a (Abb. 12) zeigt vier aromatische Protonen bei τ = 2.95, 2.79,



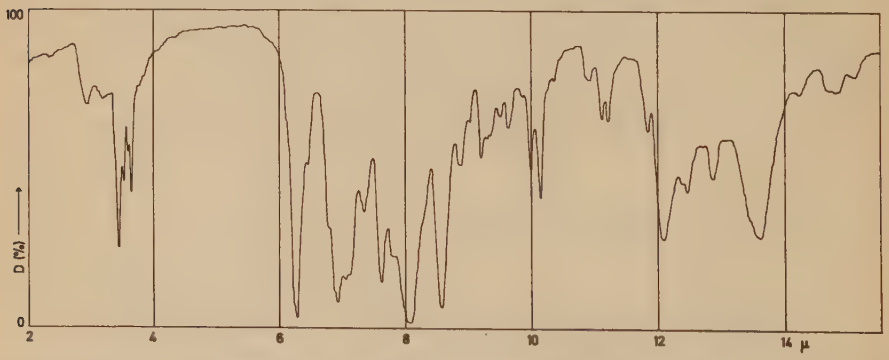
Abbild. 12 NMR-Spektrum von Rhodomin (3a) in Deuterochloroform

2.40 und 2.21 ppm. Vergleicht man die τ -Werte dieser Protonen und ihr Kopplungsschema mit denen des Methylcyclopentanderivats 20 (Seite 9), so stimmen drei der vier Protonen in ihrer chemischen Verschiebung und ihren Kopplungskonstanten fast völlig überein. Daher hat das vierte Proton H_3, das nicht koppelt, keine benachbarten Protonen und muß ortho-ständig zur Alkylseitenkette sein.

Die übrigen NMR-Daten sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Das NMR-Spektrum von 3a zeigt ein interessantes Phänomen. Die Protonen der phenolischen Hydroxygruppen sind überraschenderweise weder in Deuterochloroform noch in Tetrachlokohlenstoff sichtbar.+) Da ihre Signale in andern 1.4.5.-Trihydroxyanthrachinonen-derivaten deutlich zu sehen sind, muß in 3 die Dimethylaminogruppe für das Verschwinden dieser Banden verantwortlich gemacht werden. Ähnliche Beobachtungen hat man an bestimmten Amino-naphthazarinen gemacht[33].

Daß in 3 tatsächlich drei phenolische Hydroxyle vorliegen, wird durch die folgenden Befunde gesichert:
1) Im IR-Spektrum (Abb. 13) erkennt man an der Lage der Chinon-



Abbild. 13 IR-Spektrum des Rhodomins in Kaliumbromid

+) Wegen der geringen Löslichkeit konnte in d-Dimethylsulfoxid kein NMR-Spektrum aufgenommen werden.

τ(ppm)	J (Hz)	Int.	Form	Zuordnung der Signale
2.21	J_{87}=7.0 J_{86}= 2.0	1	Q	H_8
2.40	$J_{76}+J_{78}$ = 16.0	1	T	H_7
2.79	J_{67}=7.5 J_{68}= 2.0	1	Q	H_6
2.95	----------	1	S	H_3
7.35	----------	3	M	Benzyl-CH_2 und ein Cyclohexan-H
7.6	----------	1	M	Cyclohexan-H
7.74	----------	6	S	$N(CH_3)_2$
7.9-8.8	----------	10	M	Cyclohexan-H

Tabelle 1: Kernresonanz-Daten des Rhodomins 3a in $CDCl_3$.

S = Singulett, T = Triplett, Q = Quadruplett, M = Multiplett.

carbonylbande bei 1590 cm^{-1} (6.28 µ), daß die Chinonsauerstoffatome im Rhodomin durch Wasserstoffbrücken mit α -Hydroxylen verbunden sind.

2) Das in Kohlenstofftetrachlorid aufgenommene Absorptionsspektrum (Abb. 14) charakterisiert 3 als Derivat des 1.4.5.-Trihydroxy-anthrachinon-(9.10.).

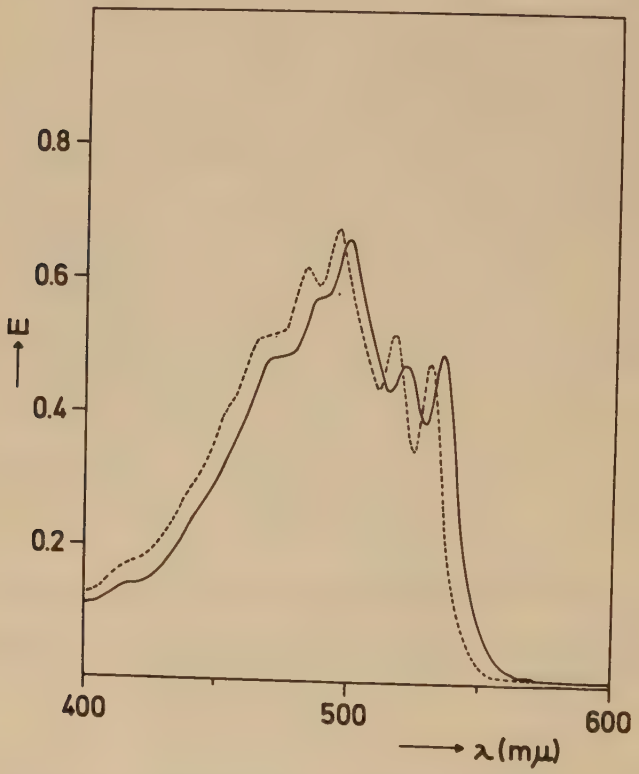


Abb. 14 Elektronenspektren in Kohlenstofftetrachlorid

——— Rhodomin (3a) (λ_{max} 535, 522, 499, 488, 472 mµ)

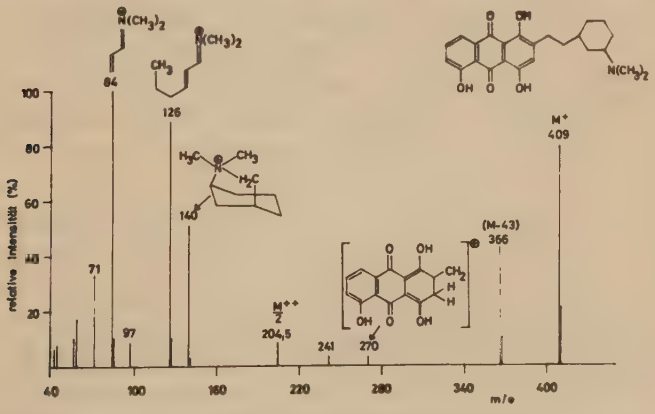
- - - - 1.4.5.-Trihydroxy-anthrachinon-(9.10.) (4) (λ_{max} 529, 516, 495, 483, 472 mµ)

3) Durch Einwirkung von p-Toluosulfonsäuremethylester läßt sich 3 in ein Trimethoxyderivat überführen, dessen Protonenresonanz-Spektrum drei Singuletts bei ? = 6.01 ppm zeigt. Der Wert dieser chemischen Verschiebung ist für 1.4.5.-Trimethoxy-anthrachinone charakteristisch[2].

4) Die Analysendaten und das massenspektrometrisch gefundene Molekulargewicht passen ebenfalls nur auf ein Molekül der Formel 3.

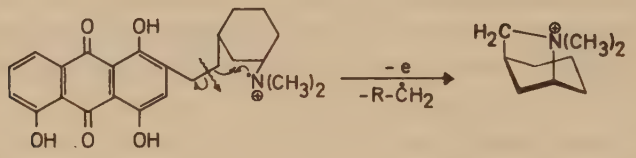
Darüber hinaus lassen sich die beim massenspektrometrischen Abbau erhaltenen Bruchstücke durch die Struktur 3 interpretieren. Neben den schon im Massenspektrum der 3-Dimethylaminocyclohexylcarbonsäuremethylester 15 auftretenden Spaltprodukte mit den Massenzahlen 84 und 126, sind für die Verbindung 3 (Abb. 15) vor allem Fragmente der Massenzahlen 366, 270, 204,5 und 140 charakteristisch.

Das Ion der Massenzahl 366,M-43, entsteht durch Spaltung der, der Dimethylaminogruppe benachbarten, C-C-Bindung, wobei ein Propylradikal eliminiert wird. Es entspricht damit dem Esterfragment der Massenzahl 142 (s. Seite 14). Die Massenspitze bei 204,5 entspricht dem doppelt positiv geladenem Molekülion.



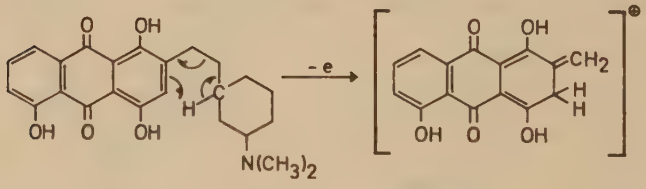
Abbild. 15 Massenspektrum von Rhodomin (3a)

Das Ion der Massenzahl 140 entsteht wahrscheinlich durch primäre Ionisation der Dimethylaminogruppe und Bindungsbruch in der Äthanbrücke:



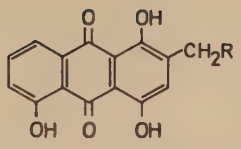
3 MZ 140

Außerdem sollte eine Bindungsspaltung in der Benzylstellung bevorzugt ablaufen[13c]. Das daraus hervorgehende Anthrachinonfragment hat eine Massenzahl von 270. Das kann plausibel durch eine McLafferty-Umlagerung gedeutet werden:

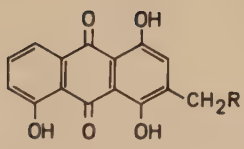


3 MZ 270

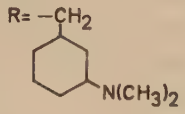
Weder das Massen- noch das NMR-Spektrum unterscheidet zwischen den Strukturen 3a und 3b:



3a

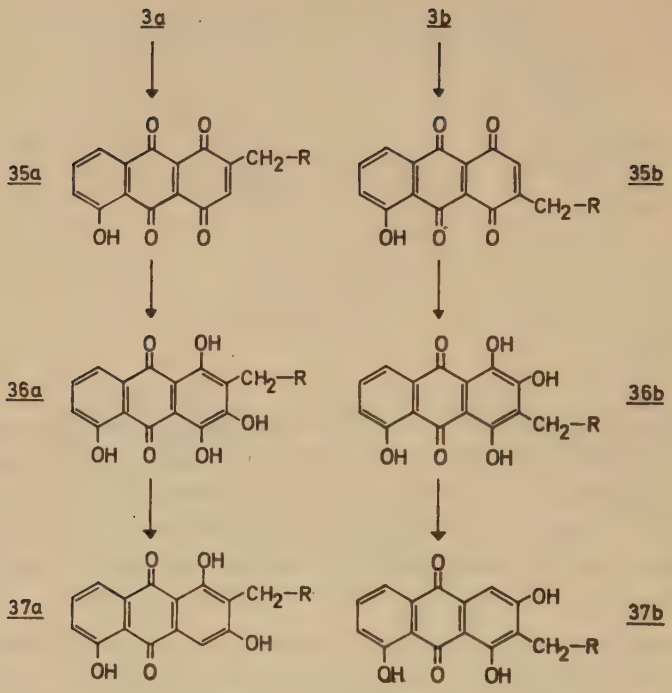


3b



Auch das IR-Spektrum des bei der Marshalk-Kondensation anfallenden Nebenproduktes ist fast völlig identisch mit dem des Hauptprodukts. Während das Hauptprodukt bei 179.5-180° schmilzt, liegt der Schmelzpunkt seines Isomeren nur um 3° darunter. Der Mischschmelzpunkt der beiden sublimierten Substanzen (1:1) beträgt 172-173° (Sintern ab 160°).

Die endgültige Zuordnung der Syntheseprodukte erfolgte nach einem von H.Brockmann und W.Müller entwickeltem Verfahren. Dazu oxydiert man 3a bzw. 3b mit Blei-IV-acetat zum Anthradichinon-(1.4.9.10.)-derivat 35 [11]. An 35a u. b wird dann nach Thiele Essigsäureanhydrid addiert und sofort anschließend mit konz. Schwefelsäure verseift. Damit hat man eine ß-Hydroxygruppe eingeführt und erhält 36. Nun entfernt man aus 36 mit alkalischer Natrium-dithionit-lösung selektiv das zur neu eingeführten ß-OH-Gruppe benachbarte α-Hydroxyl. Dadurch entsteht 37a oder 37b, die sich durch ihr Pyroboracetatspektrum unterscheiden lassen. Nach O.Dimroth u. T.Faust[23] besitzt 37a ein längerwelliges Spektrum als 37b, weil ein 1.3.5.-Trihydroxy-anthrachinonderivat einen Diboressigsäureester bildet. Demgegenüber ist das Pyroboracetatendsprektrum von 37b zu kürzeren Wellen hin verschoben, weil es als



1.3.8.-Trihydroxy-anthrachinonderivat nur zu einem Monoboressigsäureester reagieren kann.

Pyroboracetat-Endspektren:

37a: 569, 525 mμ

37b: 511, 477 mμ

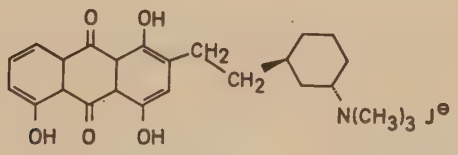
Wie die im Prismenspektroskop gemessenen Werte zeigen, liefert das Isomere, das man durch Abbau des Hauptproduktes erhält, eine längerwellige Verschiebung von 58 mμ verglichen mit dem niedriger schmelzenden Nebenprodukt.

Damit ist bewiesen, daß das synthetisierte Anthracyclin-Analogon, Rhodomin, tatsächlich die Struktur 3a besitzt.

Da das Absorptionsspektrum des Rhodomins stark temperaturabhängig ist, dürfte es bei 25° in wässrigem Medium assoziiert vorliegen.

4) Darstellung des Rhodomin-methojodids (38)

Zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit des Rhodomins wurde es in das quarternäre Ammoniumjodid überführt. Die Quarternisierung von Rhodomin nach den üblichen Verfahren[24] ist durch Umsetzen mit Methyljodid in alkoholischer Lösung leicht durchzuführen. Man erhält durch Umkristallisieren aus Methanol/Wasser rote Nadeln, die im Dünnschichtchromatogramm als einheitliche Zone laufen. In Wasser und in Dimethylsulfoxid ist das Methojodid 38 besser löslich als Rhodomin.



38

Das UV- und IR-Spektrum von 38 weist nur geringfügige Unterschiede gegenüber dem des Rhodomins auf.

Um sicherzustellen, das tatsächlich nur die gewünschte N-Methylierung eingetreten war, wurde das Protonenresonanz-Spektrum aufgenommen. In dem in d-Dimethylsulfoxid gemessenen NMR-Spektrum fehlen bei 60 MHz die zu erwartende Protonensignale der drei phenolischen Hydroxyle. Das liegt an der geringen Löslichkeit von 38, denn mißt man den Resonanzbereich 28mal bei 100 MHz und speichert die Ergebnisse nach dem CAT-Verfahren elektronisch, werden die Signale der drei phenolischen Hydroxygruppen bei τ = -3.4 (rel.Int. 2) und τ = -4.5 (rel. Int. 1) sichtbar.

C. Zur Wechselwirkung von Rhodomin und verschiedener Anthracycline mit Desoxyribonucleinsäure

Es ist bis heute nur bei einigen wenigen Antibiotika, zum Beispiel dem Penicillin und dem Actinomycin gelungen, einen genaueren Einblick in die von ihnen verursachten Veränderungen im Stoffwechselgeschehen zu gewinnen.

Nach einem von W. Müller [25] entwickelten Modell vermag sich Actinomycin zwischen die Basenpaare der DNS einzuschieben. Wegen seiner einzigartigen Chromopeptidstruktur kommt es dabei zur Ausbildung relativ langlebiger Actinomycin/DNS-Komplexe, die die RNS-Polymerase und somit schließlich die Proteinbiosynthese hemmen.

Da auch ß-Rhodomycin A einerseits mit der DNS Komplexe bildet und andererseits die RNS-Polymerase blockiert [6], schien es interessant, diesen Anthracyclin/DNS-Komplex näher zu charakterisieren, und ihn mit denen des Rhodomins und dessen Methojodid zu vergleichen.

I. Spektraleffekte und Absorptionsisothermen der Farbstoff/DNS-Komplexe

Bei der Wechselwirkung von Farbstoffen mit Nucleinsäuren sind gewöhnlich typische Spektraleffekte zu beobachten. Wie die Abb. 16 zeigt, wird auch das Maximum des Rhodomin-methojodids bei 493 mμ in BPES-Puffer pH 7 nach Zugabe von Kalbsthymus-DNS um 12 mμ bathochrom verschoben. Außerdem tritt eine Schulter, die im Absorptionsspektrum des freien Farbstoffs bei etwa 528 mμ nur schwach ausgebildet ist, im Komplex mit DNS als neues Maximum bei 540 mμ hervor. Verbunden mit dieser langwelligen Verschiebung, ist eine Senkung der Extinktion, die im Falle des Rhodomin-methojodids bei 490 mμ 44 % beträgt.

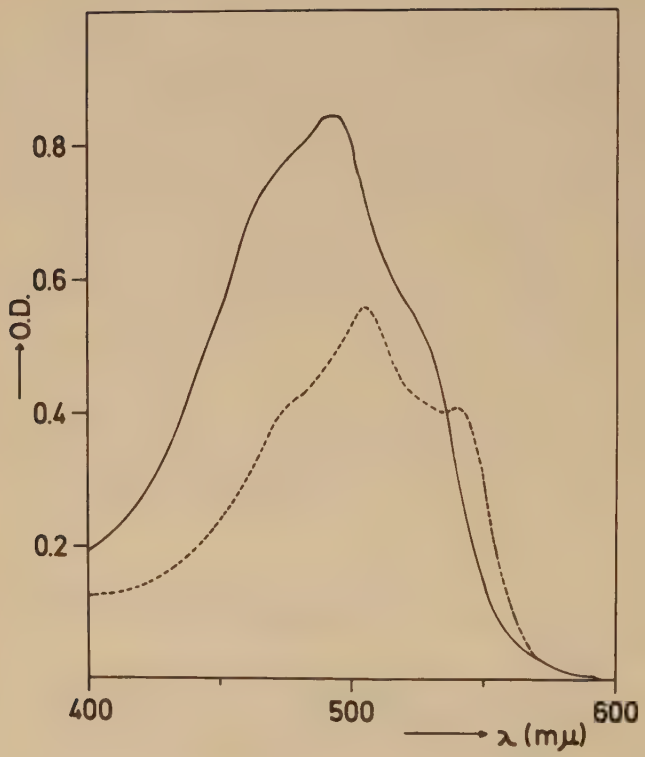


Abb. 16 Absorptionsspektren in BPES-Puffer, pH 7.0
———— Rhodomin-methojodid (31) (λ_{max} 493, 528 mμ)
------- Rhodomin-methojodid + DNS (λ_{max} 505, 540 mμ)

Eine entsprechende bathochrome Verschiebung und Extinktionserniedrigung ist auch in den Absorptionskurven der Anthracycline nach dem Zusatz von DNS zu beobachten. Beispielsweise wird das Maximum des ß-Rhodomycins A in BPES-Puffer bei 25° dadurch von 497 mμ nach 511 mμ verschoben und ein zweites

Maximum wird im Komplex-Spektrum bei 547 mμ sichtbar; hier wird die Extinktion bei 490 mμ durch die Komplexbildung um 50 % gesenkt.

Diese Spektraleffekte werden ausgenutzt, um die Bindung der Anthracycline und des Rhodomins an die DNS zu messen. Bei diesem Verfahren geht man so vor, daß einer vorgegebenen DNS-Konzentration definierte Mengen an Farbstoff zugesetzt werden. Das sich jeweils einstellende Gleichgewicht zwischen freien und komplexierten Farbstoff wird spektralphotometrisch bestimmt. Man mißt wegen der Genauigkeit bei einer Wellenlänge, bei der das Differenzspektrum zwischen freien und gebundenen Anthracyclin ein Maximum aufweist. Der komplexiert vorliegende Anteil des Farbstoffs c_K läßt sich dann nach der folgenden Beziehung berechnen (1) :

$$c_K = \frac{\bar{c} \cdot \varepsilon_\lambda - O.D.\lambda}{\Delta\varepsilon_\lambda} \qquad (1)$$

$\bar{c}$ = molare Gesamtkonzentration an Farbstoff

ε_λ = molare Extinktionskoeffizient des freien Farbstoffs bei einer bestimmten Wellenlänge λ

$O.D.\lambda$ = Extinktion der Lösung bei der Wellenlänge λ

$\Delta\varepsilon_\lambda$ = Unterschied in den Extinktionskoeffizienten für freien und gebundenen Farbstoff bei der Wellenlänge λ

Die Extinktionskoeffizienten der Komplexe wurden jeweils gesondert bestimmt (siehe experimentellen Teil). Die Daten, die zur Auswertung der Meßergebnisse benutzt wurden, sind in der nachfolgenden Tabelle 2 zusammengefaßt.

Substanz	λ_{max}	$\lambda_{\Delta\varepsilon max}$	ε_F	ε_k	$\Delta\varepsilon$
ß-Rhodomycin A	$^{497}_{\varepsilon = 13\ 900}$	490	13 560	6 600	6 960
ß-Rhodomycin B	497	490	13 560	6 320	7 240
Rhodomin	493	490	12 830	7 790	5 040
Rhodomin-methojodid	$^{493}_{\varepsilon = 14\ 450}$	490	12 800	7 850	4 950
y-Rhodomycin A	497	483	12 130	6 490	5 640
ε-Pyrromycin	$^{490}_{\varepsilon = 14\ 400}$	465	12 700	5 780	6 920

Tabelle 2: Optische Daten von Anthracyclin-, Rhodomycin-Analoga und ihrer DNS-Komplexe. Alle Werte gelten für BPES[+)]-Puffer pH 7 und 25° C. (Wellenlängenangaben in mμ)

Die im Gleichgewicht vorliegende Konzentration an freiem Liganden m ergibt sich aus der Differenz von Gesamtkonzentration $\bar{c}$ und der Komplexkonzentration c_K:

$$m = \bar{c} - c_K \qquad (2)$$

Zur Auswertung der Meßergebnisse ist es notwendig, die Beladung r zu kennen. Die Größe r ergibt sich für das jeweilige Absorptionsgleichgewicht durch Division der Konzentration an gebundenem Farbstoff c_K durch die DNS-Konzentration, ausgedrückt in Mol Basenpaar pro Liter. Die Einheit Basenpaar wird benutzt, weil das Molekulargewicht der hochpolymeren Nucleinsäure nicht genau bekannt ist.

+) siehe Seite 59

II. Auswertung der Meßergebnisse

Wenn es auf dem Makromolekül nur eine Art von Bindungspunkten gibt, die Besetzung eines Bindungspunktes keinen Einfluß auf die Ligandenaffinität des benachbarten ausübt und die gebundenen Liganden nicht untereinander in Wechselwirkung treten, kann die Komplexbildung durch folgenden von Langmuir entwickelten Ausdruck angegeben werden[26]:

$$\Theta = \frac{k_o\, m}{1+k_o m} \qquad (3)$$

Θ = dem Verhältnis der im Gleichgewicht vorhandenen Polymerbeladung zur maximal möglichen Beladung

k_o = dem Verhältnis der Absorptions- und Desorptionsgeschwindigkeiten (sog. Stabilitätskonstante des Farbstoff-DNS-Komplexes)

Wenn man für Θ das Verhältnis r/B_o einführt, erhält man nach Umformung aus (3) die von Scatchard [34] angegebene Gleichung (4):

$$\frac{r}{m} = k_o(B_o - r) \qquad (4)$$

r = Beladung, ausgedrückt in gebundenen Liganden pro Basenpaar der DNS $= \frac{c_K}{c_{DNS}}$

B_o = maximale Anzahl der Bindungsplätze pro Basenpaar der DNS

Die Auftragung r/m gegen r sollte unter den genannten Voraussetzungen eine Gerade mit dem Anstieg $-k_o$ ergeben. Der Schnittpunkt mit der r-Achse müßte die Anzahl der Bindungspunkte pro Basenpaar liefern.

In der nachstehenden Abbildung 17 sind die Absorptionsisothermen des ß-Rhodomycins B (2) und des Rhodomins (3a) in dieser Auftragung nach Scatchard dargestellt.

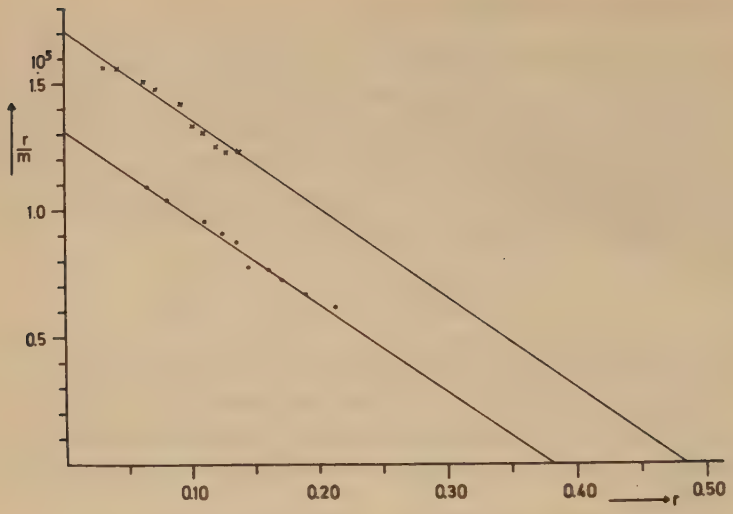


Abb. 17 Absorptionsisothermen in BPES-Puffer, pH 7.o u. 25°
.-.-.-.- ß-Rhodomycin B (2) u. Kalbsthymus-DNS
x-x-x-x- Rhodomin (3a) u. Kalbsthymus-DNS

Obwohl wegen der geringen Wasserlöslichkeit von 3a nur in einem relativ kleinen Konzentrationsbereich gemessen werden konnte, geht aus dem Diagramm hervor, daß sowohl die Absorptionsisotherme des Anthracyclins 2 wie die des Rhodomins linear verlaufen. Man kann eine Gerade durch die meisten Punkte legen; der Schnittpunkt mit der r-Achse entspricht einer Beladung der DNS von B_o = 0.38 bzw. 0.48, d.h. etwa jedes 2. - 3. Basenpaar bindet ein Farbstoffmolekül.

Auch ein Vergleich der Stabilitätskonstanten der beiden Komplexe (ß-Rhodomycin B : $k_o = 3.4 \times 10^5$ L/Mol, Rhodomin: $k_o = 3.6 \times 10^5$ L/Mol) zeigt die außerordentliche große Ähnlichkeit beider Verbindungen in ihrem Verhalten gegenüber der DNS.

Ebenfalls linear verläuft die Bindungsisotherme des ß-Rhodomycins A, die in Abb. 18 wiedergegeben ist.

ß-Rhodomycin A unterscheidet sich von ß-Rhodomycin B dadurch, daß es pro einem Mol ß-Rhodomycinon (2b) zwei Mole des Aminozuckers Rhodosamin (2a) enthält. Wahrscheinlich sind diese Zuckerreste über die beiden sekundären Hydroxygruppen am C_7- und C_9-Atom des alicyclischen Ringes A mit dem Anthrachinonrest verbunden[9].

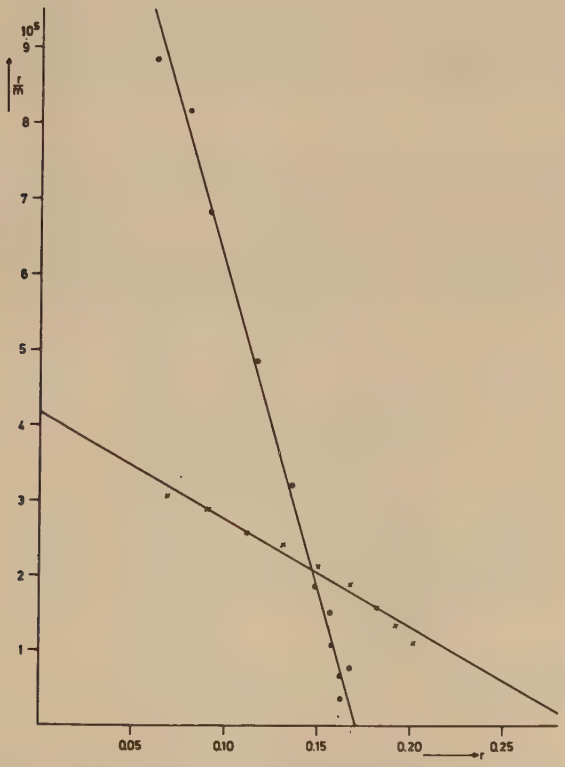
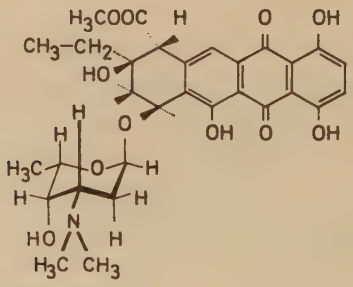


Abb. 18 Absorptionsisothermen in BPES-Puffer, pH 7.o u. 25°
.-.-.-.- ß-Rhodomycin A u. Kalbsthymus-DNS
x-x-x-x- ε-Pyrromycin (39) u. Kalbsthymus-DNS

Für das ß-Rhodomycin A ergibt sich eine Stabilitätskonstante von 8.6 x 10^6 L/Mol, also etwa um den Faktor 25 größer als beim Rhodomin und ß-Rhodomycin B. Gleichermaßen auffallend ist die Tatsache, daß der B_0-Wert für ß-Rhodomycin A 0.17 beträgt, d.h. nur ungefähr jedes 6. Basenpaar vermag ein Anthracyclinmolekül zu binden. Die Anzahl der Bindungsplätze sinkt also beim Übergang von den nur einen Dimethylaminorest enthaltenden ß-Rhodomycin B und Rhodomin zum ß-Rhodomycin A etwa um die Hälfte ab. Das erklärt sich zwanglos aus der eben erwähnten Tatsache, daß ß-Rhodomycin A zwei Aminozuckerreste besitzt, die mit 2 Phosphatresten in elektrostatische Wechselwirkung treten.

Die andere, flacher verlaufende Bindungsisotherme der Abb.18 ist die des ε -Pyrromycins. Nach den Untersuchungen von H.Brockmann und W.Lenk [27] kommt ihm die folgende Formel 39 zu. Im Gegensatz zu allen bisher erwähnten Anthracyclinen ist im ε -Pyrromycin die Verknüpfungsstelle zwischen Rhodosamin (2a)



39

und dem Hydroxy-tetracenchinonrest also bekannt. Nicht geklärt ist dagegen, ob der Aminozucker α - oder ß-glykosidisch mit dem ε -Pyrromycinonmolekül verbunden ist. In Formel 39 ist willkürlich eine trans- bzw. α -Verknüpfung über das C_7-Atom angenommen.

ε -Pyrromycin (39) unterscheidet sich vom ß-Rhodomycin B nach den bisherigen Kenntnissen an zwei Stellungen: 1. hat eine phenolische Hydroxygruppe den Platz gewechselt, und zwar dergestalt, daß der 1.4.5.-Trihydroxy-anthrachinonteil des ε -Pyrromycins über die 6.7.-Stellung mit dem alicyclischen Ring A annelliert ist, 2. befindet sich am C_{10}-Atom des Ringes A statt eines sekundären Hydroxyls eine Methoxycarbonylgruppe.

Aus dem Anstieg der Bindungsisothermen von 39 (Abb. 18) ergibt sich für die Stabilitätskonstante ein Wert von $k_o = 1.4 \times 10^6$ L/Mol. Nach dem apparenten B_o-Wert von 0.29 scheint etwa jedes 3.-4. Basenpaar der DNS als Bindungspunkt zu dienen.

Auch die in BPES-Puffer gemessene Absorptionsisotherme des γ -Rhodomycins A (Abb. 19) hat in der Scatchard-Auftragung einen linearen Verlauf. Sie ist gekennzeichnet durch eine relativ kleine Stabilitätskonstante von $k_o = 1.0 \times 10^5$ L/Mol und einen verhältnismäßig geringen Wert der Beladung von 0.17, also gleich dem B_o-Wert von ß-Rhodomycin A.

γ -Rhodomycin A enthält pro Mol γ -Rhodomycinon zwei Mole Rhodosamin (2a). Die genaue Konstitution ist nicht bekannt.+)

In den je zwei Rhodosaminreste enthaltenden Antibiotika, ß-Rhodomycin A und γ -Rhodomycin A scheinen die basischen Dimethylaminogruppen also miteinander um die vorhandenen Bindungsplätze zu konkurrieren. Dadurch erklärt sich die Erhöhung der B_o-Werte beim ε -Pyrromycin, Rhodomin und, wie oben erwähnt, beim ß-Rhodomycin B.

In der Abb. 19 ist außerdem die Bindungsisotherme des Rhodominmethojodids (38) wiedergegeben. Sie zeigt eindeutig einen

---

+) Nach Th.Waehneldt[9] ist einer der Zuckerreste an die sekundäre C_7-Hydroxygruppe, der andere an das tertiäre C_9-Hydroxyl gebunden.

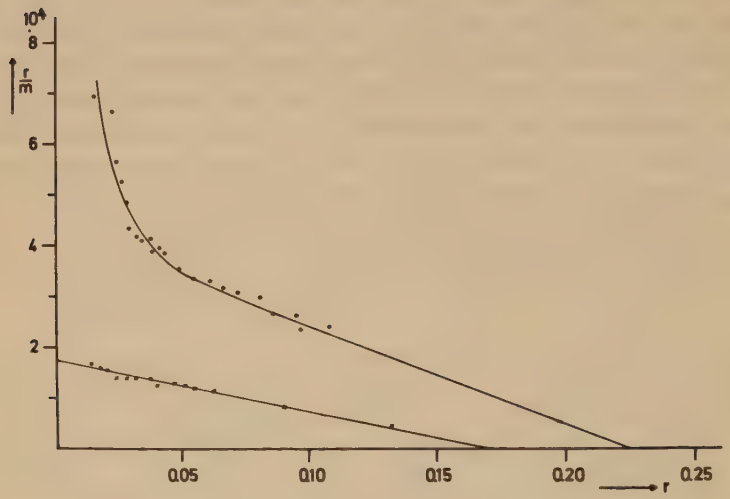


Abb. 19 Absorptionsisothermen in BPES-Puffer, pH 7.0 u. 25°
-.-.-.- Rhodomin-methojodid (38) u. Kalbsthymus-DNS
x-x-x-x γ-Rhodomycin A u. Kalbsthymus-DNS

nichtlinearen Verlauf. Versucht man die Kurve durch zwei Geraden anzunähern, was zwei verschiedenen Absorptionsprozessen entsprechen könnte, erhält man für hohe Farbstoff-Konzentrationen eine apparente Stabilitätskonstante k_o = 2.0 x 10^5 L/Mol und einen apparenten B_o-Wert von 0.23, d.h. jedes 4.-5. Basenpaar scheint ein Molekül des Quartärsalzes 38 zu binden. Diese Auswertung müßte durch weitere Messungen gesichert werden.

Wie erste Ergebnisse zeigen, ist Rhodomin-methojodid sowohl im RNS- wie im DNS-Polymerase-Test ähnlich hochwirksam wie ß-Rhodomycin A +).

+) Für die Durchführung dieser Versuche danke ich den Herren Dr.H.Sternbach und Dr.Th.Jovin.

III. Diskussion der Ergebnisse

Die Stabilitätskonstanten und B_o-Werte der Farbstoff/DNS-Komplexe sind in der Tabelle 3 mit der antibiotisch wirksamen Grenzkonzentration[2)] zusammengestellt.

Tabelle 3

Substanz	k_o (L/Mol)	B_o	Wirksame Grenzkonzentration +)
ß-Rhodomycin A	8.6×10^6	0.17	$1 : 2 \times 10^7$
ß-Rhodomycin B	3.4×10^5	0.38	$1 : 5 \times 10^6$
Rhodomin	3.5×10^5	0.48	---
Rhodomin-methojodid	2.0×10^5	0.23	$1 : 4 \times 10^4$
γ -Rhodomycin A	1.0×10^5	0.17	$1 : 4 \times 10^4$
ε-Pyrromycin	1.4×10^6	0.29	$1 : 4 \times 10^5$

+) gegen St.aureus-Stämme getestet.

Dieser Tabelle kann man entnehmen, daß kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen den Stabilitätskonstanten und B_o-Werten einerseits und der antibiotisch wirksamen Grenzkonzentration andererseits zu existieren scheint.

Vergleicht man die in den Abbildungen 17 - 19 wiedergegebenen Bindungsisothermen miteinander, ist erkennbar, daß alle mit Ausnahme der des Rhodomin-methojodids linear verlaufen. Das Abbiegen der Isotherme von 38 bei niedriger Farbstoffkonzentration kann verschiedene Ursachen haben. Da das Methojodid dem Beerschen Gesetz bis zu Konzentrationen von 10^{-5} m gehorcht, darf eine Eigenassoziation von 38 in diesem Bereich ausgeschlossen werden.

Da das strukturell gleichgebaute Rhodomin eine normale, d.h. lineare Absorptionsisotherme besitzt, muß der quarternäre Stickstoff des Methojodids für dieses unterschiedliche Verhalten gegenüber der DNS verantwortlich gemacht werden.

Dieser Quartärsalz-Effekt, auf dem das konkave Aussehen der Isotherme beruhen könnte, wird durch eine gegenseitige Beeinflussung benachbarter Farbstoffmoleküle hervorgerufen. Wenn man für die freie Wechselwirkungsenergie zwischen benachbarten, an der DNS gebundener Farbstoffmoleküle negative Werte annimmt, d.h. Werte, wie sie einer elektrostatischen Abstoßung entsprächen, erhält man rechnerisch tatsächlich konkav durchgekrümmte Bindungskurven[26].

Die gemessenen Bindungsisothermen reichen allein nicht aus, genauere Aussagen über die Struktur des Anthracyclin/DNS-Komplexes zu machen.

Da im Elektronenspektrum ein starker Spektraleffekt auftritt, liegt es nahe zu vermuten, daß der Chromophor der Anthracycline entscheidend an der Bindung zur DNS beteiligt ist. Diese Bindung kann jedoch sowohl über Wasserstoffbrücken als auch durch Dipol-Dipol-Kräfte wie durch π-π- und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Anthrachinonteil der Farbstoffe und den Basenpaaren der DNS möglich sein. Andererseits findet eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen der basischen Dimethylaminogruppe der Anthracycline und den Phosphatresten der Nucleinsäure statt; denn es ist bekannt, daß stark basische Amine an die DNS gebunden werden[31].

Ob sich die Anthracycline durch ionische Bindung über die Phosphatreste der DNS anlagern und dann durch Wasserstoffbrücken außen an der Doppelhelix stabilisiert werden, oder ob zusätzlich ein Einschub zwischen die Basenpaare der DNS, wie beim Proflavin vorgeschlagen[32], stattfindet, muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

D. Zusammenfassung der Ergebnisse

Rhodomin, eine Modellverbindung des natürlichen Antibiotikums ß-Rhodomycin B, wurde aus 1.4.5.-Trihydroxy-anthrachinon-(9.10.) und dem bisher unbekannten trans-3-Dimethylamino-cyclohexylacetaldehyd kristallisiert dargestellt und in seiner Konstitution und Konfiguration eindeutig charakterisiert.

Bei der Synthese des trans-3-Dimethylamino-cyclohexylacetaldehyds geht man von m-Dimethylaminobenzoesäure aus, deren katalytische Hydrierung die bisher nicht beschriebenen isomeren 3-Dimethylamino-cyclohexylcarbonsäuren lieferte. Durch Reduktion der entsprechenden Methylester wurde das cis, trans-Gemisch der 3-Dimethylamino-cyclohexylcarbinole erhalten. Diese isomeren Carbinole wurden getrennt und massen- und NMR-spektroskopisch in ihrer Konstitution und Konfiguration aufgeklärt.

Eine chemische Konfigurationszuordnung ergab sich durch die leichte Cyclisierbarkeit von cis-3-Dimethylamino-cyclohexylcarbinol zu dem bisher unbekannten 5.6.-Dimethyl-6.-azonia-bicyclo-(3.2.1.)-octan.

Der Anwendungsbereich der Marshalk-Alkylierung wurde untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß sich durch Veränderung der Reaktionsbedingungen auch α, ß-ungesättigte Aldehyde und Dimethylaminoaldehyde nach Marshalk kondensieren lassen. Aus Crotonaldehyd und 1.4.5.-Trihydroxy-anthrachinon-(9.10.) wurde so erstmalig 1.4.5.-Trihydroxy-2.3.-(methylcyclopentano)-anthrachinon-(9.10.) dargestellt.

Der Mechanismus der Marshalk-Reaktion wird diskutiert.

Der Rhodomin/DNS- und der Rhodomin-methojodid/DNS-Komplex wurden untersucht und die Stabilitätskonstanten ermittelt. Diese Komplexe wurden mit den DNS-Komplexen des ß-Rhodomycins A, ß-Rhodomycins B, γ-Rhodomycins A und des ε-Pyrromycins verglichen. Dabei zeigte sich, daß Rhodomin hinsichtlich seiner

Stabilitätskonstanten und sonstigen Bindungseigenschaften ein echtes ß-Rhodomycin B-Analogon ist. Das gleiche gilt für das Rhodomin-methojodid, für welches sogar eine bakteriostatische Wirksamkeit nachgewiesen werden konnte.

Beschreibung der Versuche

Chromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie wurde Kieselgel G der Fa. Merck benutzt. Für alle säulenchromatographischen Trennungen wurde Kieselgel der Fa. Gebr. Hermann, Köln verwandt. Saures Kieselgel wurde nach einer bei H.Brockmann u. H.Gröne angegebenen Vorschrift[28] hergestellt und aktiviert.

Dragendorff-Reagens:[15] 2.6 g Wismut-carbonat und 7 g Natriumjodid werden in 25 ccm Eisessig einige Minuten gekocht. Nach 12 Stdn. saugt man durch eine Glasfritte vom Niederschlag ab. Zu 20 ccm des klaren, rotbraunen Filtrats gibt man 8 ccm Essigsäureäthylester und füllt diese Vorratslösung in eine braune Flasche, die zweckmäßig im Kühlschrank aufbewahrt wird.

Zur Bereitung der Sprühlösung mischt man 10 ccm der Vorratslösung mit 25 ccm Eisessig und 60 ccm Essigester. Die gleichmäßig besprühten Platten werden mit 0.1 n Schwefelsäure nachbehandelt. Dadurch erscheinen die Substanzen als orangerote Flecken auf grauem Untergrund.

Das Lösungsmittelsystem A bereitet man sich vor jedem Gebrauch frisch aus 2 ccm konz. Ammoniaklösung und 98 ccm Aceton. 34 ccm dieser Lösung werden mit 8 ccm Petroläther (Siedebereich 40-50°) gemischt und sofort verwendet.

Alle Schmelzpunkte wurden im Berl-Block bestimmt und sind korrigiert.

Spektren

Zur Messung der angegebenen Spektren und für die Spektraltitrationen wurden folgende Geräte benutzt:
Elektronenspektren: Zeiss PMQ II und Beckmann DB-G
IR-Spektren (KBr-Preßlinge) : Perkin-Elmer Mod. 21
NMR-Spektren: Varian A 60 und HA-100 (TMS als innerer Standard 10 ppm)

Massenspektren: Atlas CH 4
Als Durchflußphotometer diente ein Uvicord, LKB

Als Glaselektrode wurde für p_H-Bestimmungen eine Einstabmeßkette, Typ HA/401/M3/2, Fa. Ingold benutzt.

Kalbsthymus-DNS war ein hochpolymeres Produkt der Fa. Sigma, St. Louis. Für die Konzentrations-Bestimmungen von DNS-Lösungen wurde bei einer Schichtdecke von 1 cm eine optische Dichte von 0.200 = 10 DNS/ml gesetzt.

BPES-Puffer

17.8 g Na_2HPO_4 (1.Lösung) und 13.8 g NaH_2PO_4 (2.Lösung) werden getrennt in je 1000 ml Wasser gelöst. 600 ml der ersten Lösung werden mit 400 ml der zweiten Lösung zusammengegeben und auf 0.19 m (10.48 g) an Natriumchlorid und auf 0.001 m an Äthylendiamintetraessigsäure, Netriumsalz gebracht. Dieser sog. BPES-Puffer wird auf einen pH-Wert von 7.0 eingestellt.

1.4.5.-Trihydroxy-2.(3.)-propyl-anthrachinon-(9.10.): 500 mg 1.4.5.-Trihydroxy-anthrachinon-(9.10.) werden in 15 ccm Morpholin/Wasser (3:2) gelöst und in Gegenwart von Raney-Nickel bis zur Aufnahme von einem Mol Wasserstoff hydriert. Man filtriert unter Luftausschluß vom Katalysator ab in eine vorgelegte Lösung von 4 ccm frisch destillierten n-Propanal. Nach etwa 10 Min. schlägt die gelbbraun gefärbte Küpe nach rotviolett um. Das Reaktionsprodukt wird mit 2n HCl angesäuert, abfiltriert und an einer mit 1n Salzsäure aktivierten Kieselgelsäule chromatographiert. Die mit Benzol/Ligroin lauf. (80:20) rote Hauptzone enthält 551 mg (71%) des in Nadeln aus Cyclohexan kristallisierenden Produkts vom Schmp.181-182°.

UV: λ_{max} (Cyclohexan) 532, 518, 495, 485, 467 mμ

$C_{17}H_{14}O_5$ (298.28) Ber. C 68.45 H 4.73
Gef.+) C 68.59 H 4.93

+) 6 Stdn. bei 110° im Hochvak. getrocknet.

1.4.5.-Trihydroxy-2.3.-(methylcyclopentano)-anthrachinon-(9.10.), (20) : 100 mg 1.4.5.-Trihydroxy-anthrachinon-(9.10.) werden in einem Gemisch aus 9 ccm Triäthanolamin und 6 ccm Wasser in Gegenwart von Raney-Nickel 30 Min. hydriert. Die gelbbraune Reaktionsmischung wird unter Luftausschluß vom Katalysator in 3 ccm frisch destillierten Crotonaldehyd eingetropft. Nachdem die Lösung nach rotviolett umgeschlagen ist, fällt man mit 2n Salzsäure aus, filtriert und chromatographiert an einer mit n/2-Oxalsäure aktivierten Kieselgelsäule mit Chloroform/Cyclohexan/Ligroin (2:1:1). Bei der Elution entwickeln sich zwei rote Zonen, die das Methylcyclopentanderivat (20) und dessen Dimeres enthalten und in dieser Reihenfolge eluiert werden. 35.1 mg (29%), die aus Benzol in roten Nadeln kristallisieren und von 189-191° schmelzen.

UV: λ_{max} (Methanol) 568, 523, 489, 461 mμ

$C_{18}H_{14}O_5$ (310.29) Ber. C 69.67 H 4.55
Gef.+) C 69.89 H 4.49 Mol.-Gew.++) 310

+) bei 85° im Hochvak. sublimiert
Dimeres von 20: $C_{36}H_{26}O_{10}$ (618.57) Mol.-Gew.++) 618

++) aus dem Massenspektrum.
Das Elektronenspektrum des Dimeren ist fast identisch mit dem Spektrum von 20.

Cis,trans-3-Dimethylamino-cyclohexancarbonsäure (14): 55 g m-Dimethylaminobenzoesäure (12) werden in 600 ccm 1n Salzsäure gelöst mit 5 g Platinoxid nach Adams-Shriner (Degussa) bei 25° unter Wasserstoff geschüttelt. Nach 7-8 Stdn. war die berechnete Menge H_2 (3 Mol) aufgenommen. Die Hydrochloride von 14 wurde vom Katalysator abfiltriert und wiederholt aus wässriger Lösung im Vakuum abgedampft, um überschüssige Salzsäure zu entfernen. Anschließend wäscht man dreimal mit Äther. Das in derben Nadeln kristallisierende Hydrochlorid wird mit einer Dowex-Säule (50W X4, 200-400 mesh, 400 ccm Harz, H^+-Form) in die freie Aminosäuren 14 überführt. Man eluiert mit 0.5m Piperidinlösung, dampft im Vakuum ein und erhält 54.5 g (95.5%) der cis,trans-Säuren, die aus Wasser in farblosen, hygroskopischen Nadeln kristallisieren und von 221-224° unter Zersetzung schmelzen (in zugeschmolzenem Kapillarrohr).

$C_9H_{17}NO_2$ (171.23) Ber. C 63.13 H 10.00 N 8.18
Gef.+) C 62.79 H 10.03 N 8.07

+) bei 130° im Hochvak. sublimiert.

Cis,trans-3-Dimethylamino-cyclohexancarbonsäure-methylester (15): 44 g cis,trans-3-Dimethylamino-cyclohexancarbonsäure (14) werden in ca. 100 ccm Methanol gelöst und tropfenweise mit einer ätherischen Diazomethanlösung versetzt bis die Stickstoffentwicklung beendet ist. Dann wird ein geringer Überschuß an Diazomethan hinzugefügt und eine Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Im Dünnschichtchromatogramm (auf

Natriumbicarbonat aktiviertem Kieselgel G) erscheint der farblose Methylester 15 nach dem Besprühen mit Dragendorff-Reagens als orangeroter Fleck. Im System Methanol/Chloroform (1:1) bleibt das Ausgangsprodukt 14 am Startfleck hängen, während der Ester 15 wandert. Nach dem Einengen im Vakuum erhält man 43.5 g (91%) des farblosen Esters.

Sdp. 88-90°/ 4mm Hg. n_D^{20} 1.4641

$C_{10}H_{19}NO_2$ (185.26) Ber. C 64.83 H 10.34 N 7.56
Gef. C 64.77 H 10.33 N 7.58
Mol.-Gew.+) 185

+) aus dem Massenspektrum.

Cis,trans-3-Dimethylamino-cyclohexylcarbinol (16): In einem 1 Liter-Dreihalskolben mit Tropfrichter, Rückflußkühler und Rührer löst man 4.65 g Lithiumaluminiumhydrid in 200 ccm Äther und tropft 37.0 g cis,trans-3-Dimethylamino-cyclohexancarbonsäuremethylester (15) so zu, daß der Äther mäßig siedet. Nach beendetem Zutropfen wird noch eine Stde. unter Rückfluß erhitzt. Dann kühlt man mit Eiswasser, setzt tropfenweise soviel Eiswasser hinzu wie Wasserstoff entwickelt wird, saugt vom abgeschiedenen Aluminiumhydroxid ab, schlämmt mehrere Male mit Äther auf, saugt ab und destilliert die ätherische Lösung nach dem Trocknen über Natriumsulfat im Vakuum ab. Man erhält 27 g (78%) 16.

Sdp. 99-101°/ 4mm Hg.

25 g des cis,trans Gemisches 16 wurden innerhalb von 6 Tagen an einer Teflon-Drehbandkolonne bei 2mm Hg und einem Rücklaufverhältnis von 100:1 fraktioniert. Neben einem Vorlauf von 1.9 g, der noch den Ester 15 mitenthielt, wurden zwei Hauptfraktionen aufgefangen: 6.1 g trans-Alkohol und 12.25 g cis-Alkohol (16b und 16a). Außerdem fiel eine Zwischenfraktion des Isomerengemisches 16 von 1.4 g an. Im Dünnschichtchromatogramm im System A hat der trans-Alkohol 16b den höheren R_F-Wert.

$C_9H_{19}NO$ (157.25) Ber. C 68.74 H 12.18 N 8.91
Gef. C 68.69 H 12.20 N 8.81
Mol.-Gew.+) 157

+) aus den Massenspektren des cis- und trans-Alkohols.

cis-Alkohol (12a): n_D^{20} 1.4853 Sdp. 96.0°/2mm Hg

trans-Alkohol (12b): n_D^{20} 1.4842 Sdp. 85.5°/2mm Hg.

6.6.-Dimethyl-6.-azonia-bicyclo-[3.2.1.]-octan (27): 1.57 g cis-3-Dimethylamino-cyclohexylcarbinol (16a) werden in 15 ccm Pyridin bei -10° gelöst und mit 2.11 g p-Toluolsulfonsäurechlorid versetzt. Das Reaktionsgemisch wird sofort im Vakuum eingedampft und das Produkt 27b in Form farbloser Nadeln erhalten. Das quarternäre Ammoniumchlorid 27b wird auf Kieselgel G und auf Cellulose durch Dragendorff-Reagens intensiv dunkelrot gefärbt. Die freie, quarternäre Base, die mit Hilfe eines Ionenaustauschers (Dowex 1 X8, 200-400 mesh, OH^--Form) hergestellt wird, ist eine hygroskopische und ätzende Substanz, die nicht in Glasgefäßen aufbewahrt werden kann. Während das Azabicyclo-octanderivat 27 im System A auf Kieselgel G am Startfleck absorbiert bleibt und nicht wandert, besitzt es in 1n HCl/Chloroform/Methanol (1:2:8) einen sehr hohen R_F-Wert.

Cis-3-Hydroxymethylcyclohexyl-N,N-dimethyl-N-benzyl-ammoniumbromid (32): 1.57 g cis-Alkohol 16a werden in 10 ccm Methanol gelöst und mit 4 ccm Benzylbromid 12 Stdn. bei Raumtemperatur verschlossen stehengelassen. Dann wäscht man mehrere Male mit Äther, um von überschüssigem Benzylbromid zu befreien. Nach dem Einengen im Vakuum und Trocknen über konz. Schwefelsäure und NaOH im Vakuumexsikkator, erhält man 3.1 g (98%) eines farblosen und schaumigen Produkts.
Das in d-Dimethylsulfoxid aufgenommene NMR-Spektrum zeigt die folgenden Signale: (τ in ppm, S = Singulett, M = Multiplett)

2.45 (S, Intensität 5), fünf aromatische Protonen,
5.41 (S, Intensität 2), zwei benzylische Protonen,
6.65 (M, Intensität 4), ein H_X-, u. drei $-CH_2OH$-Protonen,
7.10 (S, Intensität 6), sechs N-Methyl-Protonen,
7.5-9.2 (M, Intensität 9), neun Cyclohexan-Protonen.

p-Toluolsulfonsäureester des trans-3-Dimethylamino-cyclohexylcarbinols (17): 1.57 g trans-3-Dimethylamino-cyclohexylcarbinol (16b) werden in 15 ccm wasserfreiem Pyridin bei -10° gelöst und mit 2.11 g p-Toluolsulfo-chlorid bei Raumtemperatur solange stehengelassen bis alles Tosylchlorid gelöst ist (etwa 2-3 Tage). Im Dünnschichtchromatogramm auf neutralem Kieselgel G (Äthanol/Essigester/konz.Ammoniak 70:20:10) beobachtet man nach erfolgter Umsetzung und Besprühung mit Dragendorff-Reagens eine einheitlich wandernde rote Zone. Das reine Hydrochlorid von 17 kristallisiert in farblosen Nadeln vom Schmp. 119°. 3.3 g (95%).

$C_{16}H_{26}ClNO_3S$ (347.89)	Ber.	C 55.21	H 7.53 N 4.02
	Gef.+)	C 55.21	H 7.45 N 4.00

+) 6 Stdn. im Hochvak. getrocknet.

Zur Gewinnung des freien Tosylesters 17 wird das Hydrochlorid in Chloroform aufgenommen, dreimal mit 2n Sodalösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zu einem farblosen Öl eingedampft.

Trans-3-Dimethylamino-cyclohexyl-acetonitril (18): 1.57 g p-Toluolsulfonsäure-trans-3-dimethylamino-cyclohexylmethylester 17 werden in 20 ccm wasserfreiem Dimethylsulfoxid gelöst und mit 6 g getrocknetem Natriumcyanid 30-50 Stdn. bei Raumtemperatur kräftig geschüttelt. Der schmutzig braunen Reaktionslösung werden von Zeit zu Zeit Proben entnommen, um dünnschichtchromatographisch (neutrales Kieselgel G) im System Äthanol/Essigester/konz. Ammoniak (50:50:20) auf vollständige

Umsetzung zu prüfen. Der R_F-Wert des Nitrils 18 liegt zwischen dem des Tosylesters 17 und dem des trans-Alkohols 16b. Wenn der gesamte Tosylester 17 umgesetzt ist, wird das Reaktionsgemisch in die fünffache Menge Wasser eingegossen und mit Benzol/Petroläther (1:1) erschöpfend extrahiert. Dann wird mit 2n Sodalösung und mit Wasser frei von Dimethylsulfoxid und neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Man erhält 494 mg (66%) eines charakteristisch riechenden Öls, das zur Analyse einer Vakuumdestillation unterworfen wurde.

Sdp. 94.2°/ 2mm Hg n_D^{20} 1.4733

$C_{10}H_{18}N_2$ (166.26) Ber. C 72.24 H 10.91 N 16.85
Gef. C 71.60 N 10.80 N 16.69

IR (KBr): -C≡N-Bande 2225/cm

NMR (in $CDCl_3$), τ(ppm): 7.77 (S, Int. 8), 7.85-8.9 (M, Int.10).

Trans-3-Dimethylamino-cyclohexylacetaldehyd (19): In einen 100 ccm Vierhalskolben mit Rührer, Rückflußkühler, Thermometer und Tropftrichter werden 0.50 g Lithiumaluminiumhydrid in 13.5 ccm Äther gelöst, auf 0° abgekühlt und unter Rühren und Stickstoff innerhalb von 15 Min. 1.755 ccm wasserfreier Essigester zugetropft[22]. Man rührt 15 Min. weiter und setzt dann 1.70 g des Nitrils 18 auf einmal zu. Dabei steigt die Temperatur auf 7° an und es bildet sich nach kurzer Zeit ein zäher, hochviskoser Brei. Man rührt eine Stdn. bei 0° unter Stickstoff weiter. Anschließend setzt man 5n Schwefelsäure bei 25° bis zur sauren Reaktion hinzu, macht sodaalkalisch, extrahiert erschöpfend mit Chloroform, trocknet über Natriumsulfat und dampft im Vakuum ein. Man erhält 1.02 g (59%) des angenehm riechenden Aldehyds 19.

Das farblose, ölige Aldehyd 19 reagiert mit einer 2.4.-Dinitrophenylhydrazin-lösung in 30% Perchlorsäure zu den stereoisomeren 2.4.-Dinitrophenylhydrazon-hydroperchloraten (34a u.34b), die aus Alkohol/Wasser in goldgelben Nadeln kristallisieren

und bei 204-205° schmelzen.

$C_{16}H_{23}ClN_5O_8$ (448.83) Ber. C 42.80 H 5.18 Cl 7.92 N 15.62
Gef.+) C 42.85 H 5.38 Cl 7.95 N 15.66

+) bei 120° im Hochvak. getrocknet.

Durch Behandeln von 34a u.b mit Soda erhält man die freien 2.4-Dinitrophenylhydrazone, die aus Äthanol in Nadeln kristallisieren und bei 128° schmelzen.

1.-(trans-3.-Dimethylamino-cyclohexyl)-2.-(ß-1.4.5.-trihydroxy-anthrachinon-(9.10.)-yl)-äthan (3a) Rhodomin: 2.05 g 1.4.5.-Trihydroxy-anthrachinon-(9.10.) werden in 250 ccm Morpholin/Wasser (3:2) gelöst und in Gegenwart einer Spatelspitze Raney-Nickel unter Normalbedingungen bis zur Aufnahme von einem Mol Wasserstoff hydriert. Die gelbbraune Küpe wird unter Luftausschluß durch eine G 3 Fritte vom Katalysator abfiltriert direkt in 1.3 g vorgelegten trans-3-Dimethylcyclohexylacetaldehyd (19). Die Farbe der Reaktionsmischung schlägt nach kurzer Zeit nach rotviolett um. Man erwärmt noch etwa 10 Min. bei 40°, säuert mit 2n Salzsäure an, filtriert vom unlöslichen Rückstand ab, macht mit 2n Sodalösung alkalisch und extrahiert mit Chloroform. Man erhält 2.1 g (67%) Rohprodukt.

Man trennt die Reaktionsprodukte an einer Säule (120 x 8 cm) aus grobem, neutralem und nichtaktiviertem Kieselgel (Fa. Hermann, Köln) und aktiviertem Gips (3 Stdn. bei 160° im Trockenschrank). Man mischt die beiden Komponenten trocken und im Verhältnis 1:1 miteinander und schlämmt im System Methanol/Aceton/Xylol 1:1:1 + 5% Ameisensäure ein.

Bei der Elution entwickeln sich vier Zonen. Die am schnellsten wandernde, ist rotviolett gefärbt. Der Inhaltsstoff enthielt 622 mg, die aus Tetrachlorkohlenstoff in langen Nadeln kristallisierten und sich im Dünnschichtchromatogramm in mindestens fünf neue Zonen auftrennen ließ. Diese Produkte wurden nicht näher untersucht.

Die rote Hauptzone, die an zweiter Stelle eluiert wurde, enthielt 1.1 g Rhodomin 3a (37%). Aus der dritten, ebenfalls rotgefärbten Zone wurden 140 mg 3b gewonnen. Der Inhaltsstoff der vierten, roten, violettstichigen Zone enthielt 150 mg eines Stoffes, der nicht näher charakterisiert wurde.

3a kristallisiert in derben, roten Nadeln aus Äthanol/Chloroform, die bei 179.5-180° schmelzen.
Mischschmp. mit 2b: 172-173° (Sintern ab 160°)

UV: λ_{max} (Tetrachlorkohlenstoff) 535, 522, 499, 488, 472, 292
(ε_{499} = 14 530)

λ_{max} (Piperdin) 611, 569, 532
(ε_{611} = 17 370)

λ_{max} (konz.Schwefelsäure) 584, 547, 330, 270
(ε_{584} = 24 400)

$C_{24}H_{27}NO_5$ (409.46) Ber. C 70.40 H 6.65 N 3.42
Gef.+) C 70.43 H 6.66 N 3.31
Mol.-Gew.++) 409

+) bei 100° im Hochvak. getrocknet
++) aus dem Massenspektrum

Rhodomin-methojodid (38) : 200 mg Rhodomin 3a werden in 30 ccm Chloroform/Äthanol (2:1) gelöst. Man fügt 10 ccm Methyljodid hinzu und kocht drei Stdn. unter Rückfluß. Nach ca. einer halben Stde. beginnt der quarternisierte Produkt 38 auszufallen. Die Ausbeute ist nahezu quantitativ. Man dampft im Vakuum ab und kristallisiert aus Methanol/Wasser um. Rote Nadeln vom Schmp. 274°.

UV: λ_{max} (Methanol) 525, 511, 491, 481, 465, 288, 251, 228
(ε_{491} = 14 535)

λ_{max} (Dimethylsulfoxid) 528, 495, 291, 256
(ε_{495} = 13 130)

λ_{max} (Piperidin/Wasser 1:1) 604, 566
(ε_{694} = 11 890)

λ_{max} (konz. Schwefelsäure) 584, 545, 330, 270
(ε_{584} = 24 520)

$C_{25}H_{30}JNO_5$ (551.4) Ber. C 54.41 H 5.48 J 23.01 N 2.54
Gef. C 54.50 H 5.64 J 22.85 N 2.56

Bakt. Wirksamkeit bei Bac. subtilis und bei St. aureus
bis zur Verdünnung 1 : 40 000 (Actinomycin C_1 1 : 6.4 Mill.).

Messung der Absorptionsisothermen des Rhodomins und verschiedener Anthracycline

a) Spektraltitration des Rhodomins bei 25°

Zu 120 ml BPES-Pufferlösung (pH 7) in einer 20 cm Küvette, die 0.500 ml Kalbsthymus-DNS (Fa. Sigma, I) der Konzentration $c_{DNS} = 1.998 \times 10^{-5}$ m an Basenpaaren enthält, werden je 0.010 ml einer Rhodomin-Stammlösung ($c_{St.} = 3.36 \times 10^{-3}$m) in Pyridin anteilweise zugesetzt und nach gutem Durchmischen die sich jeweils einstellende optische Dichte bei 490 mμ gemessen (Zeiss PMQ II).

Die dabei erhaltenen Werte sind in der zweiten Spalte der Tabelle unter $O.D._{490}$ angegeben. Die korrigierte optische Dichte, $O.D._{korr.}$, ergibt sich durch Subtraktion des Blindwerts (ermittelt durch Küvettenvergleich ohne Farbstoffzugabe) und Division durch die Schichtdicke (l = 20 cm).

Die Werte der Gesamtkonzentration $\bar{c}$ erhält man aus dem jeweiligen Zusatz an Farbstoff-Stammlösung der Konzentration $c_{St.} = 3.36 \times 10^{-3}$ m und dem Gesamtvolumen der Meßlösung (120 ml). Die Komplexkonzentration c_k errechnet man nach Gleichung (1), Seite 46. Die Beladung r ist der Quotient aus gebundenem Anteil c_k und der DNS-Konzentration in Mol Basenpaar ($c_{DNS} = 1.998 \times 10^{-5}$ m). Der freie Anteil m des Rhodomins ergibt sich aus der Differenz der Gesamtkonzentration $\bar{c}$ und der Komplexkonzentration c_k.

Zusatz	$O.D._{490}$	$O.D._{korr.}$	$\bar{c} \times 10^{-7}$	$c_k \times 10^{-6}$	r	$m \times 10^{-7}$	$\frac{r}{\square} \times 10^{5}$
0	0.0260	---	---	---	---	---	---
10	0.0755	0.002475	2.80	0.2221	0.01112	0.579	1.920
20	0.1275	0.005075	5.60	0.4187	0.0210	1.413	1.483
30	0.1775	0.007575	8.40	0.6360	0.0318	2.04	1.561
40	0.2280	0.01010	11.20	0.8470	0.0424	2.73	1.553
50	0.2820	0.01280	14.00	1.024	0.0512	3.76	1.363
60	0.3300	0.01520	16.80	1.260	0.0630	4.19	1.500
70	0.3810	0.01775	19.60	1.462	0.0731	4.98	1.468
80	0.4310	0.02025	22.40	1.679	0.0841	5.61	1.500
90	0.4860	0.02300	25.20	1.859	0.0931	6.61	1.408
100	0.5390	0.02570	28.00	2.028	0.1015	7.72	1.315
110	0.5920	0.02830	30.80	2.222	0.1111	8.58	1.295
120	0.6480	0.03110	33,60	2.399	0.1200	9.69	1.239
130	0.6990	0.03370	36.40	2.580	0.1291	10.60	1.218
140	0.7510	0.03625	39.20	2.783	0.1397	11.37	1.224
150	0.8020	0.03880	42.00	2.982	0.1494	12.15	1.226

b) Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der freien Farbstoffe in wässrigem Medium

Im Falle der Anthracycline wurden definierte Volumina (z.B. 0.016 ml) einer Stammlösung bekannter Konzentration zu 3 ml BPES-Puffer sukzessive in einer 1 cm Küvette zugesetzt und die jeweilige Extinktion bei der entsprechenden Wellenlänge ermittelt. Diese Extinktionswerte wurden gegen die Farbstoffkonzentrationen aufgetragen. Aus dem Anstieg der sich dabei ergebenden Geraden errechnet man die molaren Extinktionskoeffizienten (s. Tabelle 2, Seite 39).

Da Rhodomin und sein Methojodid nur wenig in Wasser löslich sind, konnten hier nur geringe Farbstoffkonzentrationen eingesetzt werden. 0.050 ml Rhodomin ($c_{St.} = 3.36 \times 10^{-3}$m) ergaben in 115 ml BPES-Puffer in einer Küvette der Schichtdicke $l = 20$ cm eine Extinktion bei 490 mμ von $O.D._{korr.} = 0.375$.

Daraus errechnet sich der molare Extinktionskoeffizient des Rhodomins

$$\varepsilon_{490}^{BPES} = \frac{0.375}{2.92 \times 10^{-5}} = \underline{12\ 830}$$

c) Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der Farbstoff-DNS-Komplexe

Man pipettiert 0.050 ml einer Rhodomin-Stammlösung in Pyridin ($c_{St.} = 3.36 \times 10^{-3}$m) zu 3.00 ml einer DNS-Lösung ($c_{DNS} = 3$ mg/ml). Diese Lösung ergibt bei einer Schichtdicke von $l = 1$ cm eine Extinktion von

$$O.D._{490} = 0.429$$

Mit diesem Wert erhält man für den Extinktionskoeffizienten

des Rhodomin-DNS-Komplexes

$$\varepsilon_K^{490} = \frac{0.429}{3.36 \times 10^{-3}} = 7790$$

und für die Differenz der Extinktionskoeffizienten des freien und gebundenen Farbstoffs

$$\Delta \varepsilon_{490} = 12\,830 - 7790 = \underline{5040}$$

Analog wurden die Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Anthracyclin-DNS-Komplexe ermittelt. Sie sind in Tabelle 2, Seite 39 zusammengestellt.

Chromatographie von d,l-Rhodomin-methojodid (38) an einem Polyacrylamid-DNS-Gel

a) Herstellung des Gels: [29] Man löst 3.99 mg Acrylamid und 210 mg N,N'-Methylenbisacrylamid in 20 ml BPES-Puffer pH 7 (s. Seite 58), filtriert vom unlöslichen Rückstand ab, gibt 300 mg Kalbsthymus-DNS (Fa. Sigma, Grade II) in 50 ml BPES-Puffer (pH 7) hinzu und leitet 15 Min. Stickstoff ein. Dann fügt man 1.4 ml ß-Dimethylamino-propionitril und 140 mg Ammoniumperoxodisulfat hinzu. Nach etwa 10 Min. erstarrt die Reaktionslösung zu einem farblosen Gel, das durch ein Metallsieb (V2A, 400 Maschen/cm^2) gepreßt wird.

b) Chromatographie von d,l-Rhodomin-methojodid: Das fädige Polymerisat füllt man in eine Säule (57 x 1.4 cm), die mit einem Kühlmantel umgeben ist. Zunächst wurde solange mit BPES-Puffer (pH 7) gewaschen, bis die optische Dichte der Waschlösung bei 260 mμ unter 0.01 sank. Die Kühlflüssigkeit wurde mit einem Haake-Thermostaten auf einer Temperatur von 24.5 $\pm$ 0.02°C gehalten. Nun beschichtet man das Absorbens vorsichtig mit einer Rhodomin-methojodid-lösung (1 mg 38 in 10 ml BPES-Puffer). Die anfangs gelbrote Farbe des Metho-

jodids schlägt nach erfolgter Absorption nach rosa um. Das Eluat wurde in einem Durchflußphotometer bei 254 mμ kontrolliert. Nach achttägiger Laufzeit trat bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1 Tropfen/6 Sek. ein erstes Maximum auf, dem nach weiteren 34 Stdn. ein zweites Maximum folgte.

Bestimmung der scheinbaren Dissoziationskonstanten des Rhodomin-methojodids (38) in Borat-BPES-Puffer

a) Borat-BPES-Puffer

400 ml des BPES-Puffers (s. Seite 58) werden mit 100 ml einer Borsäurelösung zusammengegeben, die man sich durch Auflösen von 6 g Borsäure in 1000 ml Wasser bereitet. Diese Pufferlösung wurde durch tropfenweise Zugabe von 1 n Natronlauge auf den jeweils gewünschten pH-Wert eingestellt.

b) Messung der Eichkurven

Zu 10 ml Borat-BPES-Puffer (pH 8.0) wurden unter Rühren definierte Volumina (0.020 ml) 1 n Natronlauge zugesetzt. Der sich jeweils einstellende pH-Wert wurde mit einer alkalistabilen Glaselektrode (Typ HA 401, Fa. Ingold) gemessen. Die Einstabmeßkette wurde vor jeder Messung durch zwei Titrisol-Lösungen (pH 4.00 und 9.00) geeicht. Setzt man dem Borat-BPES-Puffer bis zu 0.150 ml Dimethylsulfoxid hinzu, ist keine Änderung der Eichkurve festzustellen. Die erhaltenen pH-Werte von 8.0 - 11.7 wurden gegen die NaOH-Konzentration aufgetragen.

c) Spektraltitration zur pK'-Bestimmung von 38

In eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 2 cm wurden 10 ml Borat-BPES-Puffer pH 8.0 einpipettiert. Dann wurden unter starkem Rühren (Stabmagnet, Titrierzusatz des PMQ II der Fa. Zeiss) 0.050 ml einer Stammlösung des Farbstoffs 38 in

Dimethylsulfoxid mit einer Lambda-Pipette in die Pufferlösung eingebracht. Diese Farbstofflösung wird nun durch Zugabe von jeweils 0.020 ml 1 n Natronlauge titriert. Nach jedem Laugezusatz wurde der Extinktionswert bei 590 mμ abgelesen. Dabei wurde auf konstante Temperatur geachtet. Eine Absorption des Farbstoffs an der Küvette oder am Magneten war nicht festzustellen.

Die Ergebnisse wertet man graphisch aus. Man sucht den Wendepunkt in den zur Abszisse parallelen Teilstück der Titrationskurve und liest den Ordinatenabschnitt ab. Der dem halben Ordinatenwert zugehörige Abszissenabschnitt ist gleich dem pk'-Wert des Farbstoffs 38.

Mehrere Meßreihen ergaben einen Mittelwert von

$$pK' = 8.40$$

Anhang

1. Versuch zur Racematspaltung von d,l-Rhodomin-methojodid (38)

Da Rhodomin und sein Methojodid als Racemate in der Synthese anfallen, erschien es wünschenswert, sowohl die d- wie die l-Form herzustellen und ihr Komplexbindungsvermögen an die DNS zu prüfen.

Von vornherein ist ein unterschiedliches Verhalten der Enantiomeren von 38 gegenüber der optisch aktiven Desoxyribonucleinsäure zu erwarten. Deshalb versuchte ich, die Antipodentrennung mit der DNS selbst durchzuführen.

Dazu stellt man sich ein 5 % Polyacrylamid-Gel nach dem Verfahren von S.Hjerten u. R.Mosbach [29] her und setzt vor Beginn der Polymerisation der Monomerenlösung eine größere Menge DNS zu, in der Hoffnung, daß diese einpolymerisiert wird.

Die Herstellung des polymeren Gels verlief auch mit dem DNS-Zusatz normal. Das anfallende, farblose Produkt wurde durch ein Metallsieb gepreßt und mit Pufferlösung optisch rein gewaschen (siehe experimentellen Teil, Seite 72).

Beim Aufbringen einer Rhodomin-methojodidlösung auf eine Säule, die als Absorbens das mit DNS modifizierte Polyacrylamid enthielt, bildete sich nach kurzer Zeit die charakteristisch rotviolette Farbe des Farbstoff-DNS-Komplexes aus, ein Beweis, daß tatsächlich die zugesetzte DNS im Gel absorbiert war und dem Methojodid 38 zur Komplexbildung verfügbar.

Bei der spektralphotometrischen Registrierung des Eluats traten zwei Maxima auf. Das ist ein Hinweis darauf, daß die erwartete Racematspaltung einsetzte. Denn ein reiner Molekülsiebeffekt, wie er von einfachen Polyacrylamid-Gelen

bekannt ist, kann keine Antipodentrennung verursachen.

Zum genauen Nachweis muß die optische Aktivität im Eluat gemessen werden. In den bisher durchgeführten Versuchen reichte die Farbstoffkonzentration nicht aus, um einen Drehwert messen zu können.

Auch sollten weitere Experimente zeigen, wie weit diese Technik zur Racematspaltung von Farbstoffen, die DNS-Komplexe bilden und zur Trennung strukturell ähnlicher Anthracycline ausgenutzt werden kann.

2. Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Rhodominmethojodids (38)

Die Dissoziationskonstante einer stark gefärbten Säure ROH läßt sich ermitteln, wenn man durch eine Pufferlösung einen bestimmten pH-Wert vorgibt und die sich einstellende Konzentration der vorhandenen Anionen RO^- spektralphotometrisch mißt. Voraussetzung ist bei dieser Methode, daß die undissoziierte Säure ungefärbt ist. Im vorliegenden Fall wurde bei einer Wellenlänge gemessen (590 mμ), bei der die Extinktion an undissoziierter ROH kleiner 0.01 ist, also vernachlässigbar gering gegenüber der optischen Dichte des Anions.

Die auf diese Weise gemessenen Extinktionswerte wurden gegen die pH-Werte, die man aus Eichkurven erhalten hat, graphisch aufgetragen.

Für den schwachen Elektrolyten ROH 38 ist die Dissoziationskonstante K' gleich der Wasserstoffionenkonzentration, wenn eine äquimolekulare Menge an c_{RO^-} und an c_{ROH} vorliegt.

$$K' = c_{H^+} \frac{c_{RO^-}}{c_{ROH}}$$

K' = scheinbare Dissoziationskonstante von ROH

c_{H^+} = molare Wasserstoffionenkonzentration

c_{RO^-} = molare Gleichgewichtskonzentration an dissoziiertem Farbstoff

c_{ROH} = molare Gleichgewichtskonzentration an undissoziiertem Farbstoff

Aus mehreren Meßreihen ergab sich für die scheinbare Dissoziationskonstante K' von 38 in Borat-BPES-Puffer+) bei 24.2° C ein Mittelwert von

$$K' = 3.98 \times 10^{-9} \text{ Mol/L}$$

bzw. $pK' = 8.40$

K' ist keine echte Konstante, weil sie noch von der Elektrolytkonzentration abhängt.

+) Dieses Puffersystem wurde gewählt, weil 38 in BPES-Puffer pH 7.0 zu wenig löslich ist (siehe Seite 58).

Die Massenspektren wurden von Herrn Prof. G.Spiteller aufgenommen, die NMR-Spektren von Frau I.Beller und die IR-Spektren von Herrn Dipl.Chem. L.Lewejohann.

Die Hemmwirkung der Anthracycline auf die RNS-Synthese wurde von Herrn Dr. H.Sternbach untersucht.

Die Mikroanalysen führten die Herren Dr. O.Pfundt und M.Beller durch.

Ihnen allen möchte ich an dieser Stelle herzlich danken. Mein Dank gilt Herrn Dr. F.Seela für anregende Diskussionen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für finanzielle Unterstützung.

Literaturverzeichnis

1. H.Brockmann und H.Brockmann jr.
Chem.Ber. 96, 1771 (1963)

2. H.Brockmann
Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe, 21, 121 (1963)

3. L.Ettlinger, E.Gäumann, R.Hütter, W.Keller-Schierlein, F.Kradolfer, L.Neipp, V.Prelog, P.Reusser und H.Zähner
Chem.Ber. 92, 1867 (1959)

4. A.Di Marco, M.Gaetani, P.Orezzi, B.M.Scarpinato, R.Silvestrini, M.Soldati, T.Dasdia und L.Valentini
Nature (London) 201, 706 (1964)

5. E.Calendi, A.Di Marco, M.Reggiani, B.Scarpinato und L.Valentini
Biochim.Biophys.Acta 103, 25 (1965)

6. K.Koschel, G.Hartmann, W.Kersten und H.Kersten
Biochem. Z. 344, 76 (1966)

7. J.Niemeyer
Dissertation, Göttingen, 1966, Seite 19 - 21

8. Th.Waehneldt
Persönliche Mitteilung

9. E.D.Bergmann
Organic Reactions, Vol.10, 179 (1959)

10. C.Marshalk, F.Koenig und N.Ouruosoff
Bull.Soc.chim.France 5, 3, 1545 (1936)

11. H.Brockmann und W.Müller
Chem.Ber. 91, 1920 (1958)

12. M.W.Cronyn
J.org.Chemistry 14, 1013 (1949)

13. F.Sigmund
Mh.Chem. 49, 281 (1928)

14. S.M.Bloom
Tetrahedron letters (London) 1993 (1963)

15. E.Stahl
Dünnschichtchromatographie, Berlin 1962, Seite 504

16. G.Spiteller
Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen, Verlag Chemie, Weinheim 1966
a) S.117 b) S.281 c) S.149

17. H.Feltkamp, N.C.Franklin, K.D.Thomas und W.Brügel
Liebigs Ann.Chem. 683, 75 (1965)

18. H.Suhr
Anwendungen der kernmagnetischen Resonanz in der Organischen Chemie, Berlin 1965
a) S.350 b) S.133 c) S.131

19. E.L.Eliel, N.L.Allinger, S.J.Angyal und G.A.Morrison
Conformation Analysis
J.Wiley, New York 1965, S.51

20. L.Fieser und M.Fieser
Organische Chemie,
Verlag Chemie, Weinheim 1965, S.688

21. H.Feltkamp und W.Koch
J.Chromat. 15, 314 (1964)

22. H.C.Brown und P.C.Garg
J.Amer.chem.Soc. 86, 1085 (1964)

23. O.Dimroth und T.Faust
Chem.Ber. 54, 3010 (1921)

24. J.Goerdeler
Houben-Weyl-Müller, Methoden der organ. Chemie, XI/2, 598 (1958)

25. W.Müller
Habilitationsschrift Univ. Göttingen, 1967

26. R.Steiner und F.Beers
Elsevier Publ. Comp. Amsterdam, 1961, S.292

27. H.Brockmann und W.Lenk
Chem.Ber. 92, 1904 (1959)

28. H.Brockmann und H.Gröne
Chem.Ber. 91, 773 (1958)

29. S.Hjerten und R.Mosbach
Anal.Biochem. 3, 109 (1962)

30. M.E.Munk, C.S.Sodano, R.L.McLean und T.H.Haskell
J.Amer.chem.Soc. 89, 4158 (1967)

31. A.M.Liquori, L.Constantino, V.Crescenzi, V.Elia, E.Giglio und R.Puliti
J.Mol.Biol. 24, 113 (1967)

32. L.S.Lerman
J.Mol.Biol. 3, 18 (1961)

33. W.Schulte
Persönliche Mitteilung

34. G.Scatchard
Ann. N.Y. Acad.Sci. 51, 660 (1949)

35. M.Hesse, W.Vetter und H.Schmid
Helv.Chim.Acta 48, 674 (1965)

Lebenslauf

Am 10. Februar 1938 wurde ich als zweiter Sohn des Friseurmeisters Willy Flügel und seiner Ehefrau Herta Flügel, geb. Schröder in Jöllenbeck/Kreis Bielefeld geboren. Ab September 1944 besuchte ich die Volksschule in Jöllenbeck. Infolge totaler Zerstörung von Wohnung und Geschäft zogen wir nach Holzminden/Weser, wo ich die Klassen 1 - 4 der Volksschule absolvierte. Im Mai 1949 wurde ich in die Klasse 5 des Gymnasiums für Jungen in Holzminden aufgenommen. Dort erhielt ich im Februar 1958 das Reifezeugnis.

Nach einjährigem Grundwehrdienst begann ich im Sommersemester 1959 das Studium der Chemie an der Universität Göttingen. Am 25. Juli 1962 bestand ich nach Abschluß der Grundpraktika das Diplom-Vorexamen. Nach Beendigung eines Zusatzpraktikums für Organiker arbeitete ich vom Frühjahr 1963 bis September 1964 unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr.W.Müller über "Reaktionen von Actinomycinderivaten mit Makromolekülen". Am 14. Dezember 1964 legte ich das Diplom-Hauptexamen ab.

Seit Februar 1965 arbeitete ich ebenfalls unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr. W. Müller an der vorliegenden Dissertation.

Meine Lehrer waren die Herren Professoren Dr.H.Brockmann, Dr.A.Flammersfeld, Dr.B.Franck, Dr.E.U.Franck, Dr.O.Glemser, Dr.W.Jost, Dr.W.Lüttke, Dr.H.-G.Schlegel, Dr.A.Schneider, Dr.U.Schöllkopf, Dr.G.Spiteller, Dr.H.Strehlow, Dr.H.G. Wagner, Dr.J.Zemann und Herr Privatdozent Dr.W.Müller.